



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências de Botucatu**

Andre Mueller

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DOS
ADRENOCEPTORES ALFA-1 EM MODELO EXPERIMENTAL DE
EPIDIDIMITE EM RATOS**

**Botucatu-SP
2019**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências de Botucatu**

Andre Mueller

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DOS
ADRENOCEPTORES ALFA-1 EM MODELO EXPERIMENTAL DE
EPIDIDIMITE EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentado ao
programa de pós-graduação em
Farmacologia e Biotecnologia do Instituto
de Biociências da Unesp de Botucatu.
Candidato: M. Sc. Andre Mueller

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo
Co-orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da
Silva

**Botucatu-SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mueller, Andre.

Investigação funcional e molecular dos adrenocetores
alfa-1 em modelo experimental de epididimite em ratos /
Andre Mueller. – Botucatu, 2019

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo

Coorientador: Erick José Ramo da Silva

Capes: 21005001

1. Receptores adrenérgicos. 2. Contração muscular. 3.
Epididimite. 4. Músculo liso.

Palavras-chave: adrenocetores alfa-1; contração;
epididimite; músculo liso.

Auxílio Financeiro

CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

UFMT

(Universidade Federal de Mato Grosso)

Fapesp

(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)

À Família. À minha doce e querida esposa Flávia, pelo pleno amor, dedicação e sensibilidade. Às minhas filhas Bárbara, Isabela e Sofia, vocês representam um amor sem explicação. Amo vocês onde não tem espaço ou tempo, apenas nós cinco!

*Aos meus queridos pais, Robert Mueller e Margareth P. Mueller, pela
dávila da vida, incentivo, compreensão, educação e transmissão de
valores éticos e morais. Pais virtuosos que vão, e sempre foram, além do
amor empírico e transcendental pelos filhos.*

Ao meu orientador, pelo seu profissionalismo, humanismo e dedicação. Um Mestre que perpassa o inteligível, e desperta uma admiração pela sua temperança e sapiência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu incansável co-orientador, pela parceria e oportunidade de trabalhar em colaboração, e por sempre ter me recebido de portas abertas no seu laboratório.

À Prof^a Wilma Kempinas e ao seu corpo técnico, pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas.

Aos pós-graduandos que contribuíram com esse trabalho, Katiussia Pinho da Silva, Alan Andrew, Noemia e Luiz Ricardo Kiguti. Agradeço a cooperação, as discussões científicas e os agradáveis momentos de convivência.

A todos professores do Departamento de Farmacologia e do Programa de Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, que contribuíram imensamente para a minha formação acadêmica e reflexões diárias.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Ana Cristina Murcia de Souza (Cris), Hélio Kushima, Paulo Cesar Mioni, Luís A. de Oliveira e Janete, pela atenção, convivência e suporte técnico.

Ao meu irmão e amigo Daniel e sua família, pelos agradáveis momentos, e a todos meus familiares, pela companhia e palavras.

Aos meus amigos José Sérgio e Mayara por esses anos de caminhada juntos, alegrias contagiantes, profissionalismo e dificuldades que passamos.

Aos amigos e colegas do departamento, especialmente todos que se reuniam na sala 7, pelos momentos de descontração e pelo bem comum que sempre imperou entre nós.

A todas pessoas que colaboraram direta e indiretamente com a realização deste trabalho e com a minha formação.

RESUMO

Primordialmente, o epidídimo funciona para proteger e realizar a maturação de espermatozoides. A cauda do epidídimo (CE), região que armazena espermatozoides maduros até a ejaculação, recebe densa inervação de fibras pós-ganglionares simpáticas que liberam noradrenalina para contrair o músculo liso do epidídimo via ativação de adrenocetores alfa-1A (α_{1A} -ARs). As contrações da musculatura lisa têm papel importante no transporte dos espermatozoides ao longo do ducto epididimário, bem como na contração da CE distal durante a fase de emissão seminal da ejaculação. Recentemente, foi demonstrado que a epididimite, a condição inflamatória do epidídimo, induz aceleração do tempo de trânsito espermático em ratos. Nesta tese, testamos a hipótese de que essa aceleração do trânsito espermático induzida pela epididimite é resultado de alterações na contratilidade do ducto epididimário. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a contração da CE distal mediada por α_1 -ARs em um modelo experimental de epididimite aguda induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* em ratos. Após 6 e 24 h da injeção intraductal de LPS (25 μ g) para indução da epididimite (*in vivo*), estudos de contração indicaram que a potência da noradrenalina aumentou ~6 vezes na CE distal inflamada. As contrações induzidas pela noradrenalina foram competitivamente antagonizadas pelo prazosin, um antagonista não-seletivo de α_1 -ARs, com afinidades semelhantes nos grupos tratados com LPS e salina ($pA_{2\pm 8,90}$). No entanto, a potência do BMY 7378, um antagonista α_{1D} -seletivo, foi ~50 vezes maior na CE distal tratada com LPS ($pA_{2\text{ LPS}} = 8,70$ vs $pA_{2\text{ Sal}} = 6,95$), produzindo inclinação de Schild menor do que a unidade teórica. Além disso, a buspirona, um agonista seletivo para α_{1D} -ARs, foi ~3 vezes mais potente no grupo tratado com LPS ($pEC_{50\text{ LPS}} = 4,93$ vs $pEC_{50\text{ Sal}} = 4,36$) e as curvas concentração resposta (CCRs) para este agonista foram antagonizadas pelo BMY 7378, com uma potência estimada de ~8,70, consistente com a participação de α_{1D} -AR. Como suporte a esses achados, em segmentos da CE distal incubados com LPS (300 ng/mL) por 4 h *in vitro*, o BMY 7378 também antagonizou as

contrações induzidas pela noradrenalina, produzindo $pA_{2\approx 8,50}$. Além disso, a oximetazolina (agonista parcial α_{1A}) foi ~6 vezes menos potente em segmentos expostos ao LPS em comparação controle ($pEC_{50 \text{ LPS}} = 6,22$ vs $pEC_{50 \text{ Sal}} = 7,00$). Interessantemente, em tecidos que foram pré-incubados com PDTC, um inibidor de NF κ B, antes do desafio com LPS, o BMY 7378 em baixa concentração foi ineficaz em deslocar CCRs para noradrenalina. Ensaios de RT-qPCR indicaram que os níveis relativos de transcritos para α_{1a} -, α_{1b} - e α_{1d} -ARs não foram alterados na CE distal com epididimite *in vivo*. Curvas de inibição da ligação específica de [^{3} H]-Prazosin com ligantes seletivos foram realizadas. Apesar dos resultados comparáveis para prazosin e BMY 7378, sítios de baixa afinidade para RS 100329 (antagonista α_{1A} -seletivo) foram identificados, sugerindo um aumento na população de α_{1D} -ARs na CE distal inflamada. Em conclusão, a epididimite induzida por LPS alterou o subtipo funcional α_1 -AR no músculo liso da CE distal, resultando em uma população heterogênea de receptores (α_{1A} - e α_{1D} -ARs) envolvidos na resposta contrátil durante a inflamação aguda. A co-participação dos α_{1D} -ARs está correlacionada com a hipersensibilidade da noradrenalina na CE distal inflamada, e parece ser dependente do NF κ B. Essa alteração pode cooperar para um aumento na contração do ducto, evitando, assim, a ascensão de bactérias para regiões proximais do epidídimo. Entretanto, isso pode contribuir para a aceleração do trânsito espermático no epidídimo, um efeito deletério para a maturação espermática.

Palavras-chave: adrenoceptores alfa-1; epididimite; contração; músculo liso.

ABSTRACT

The epididymis works primarily to protect and mature the spermatozoon. The cauda epididymis (CE), which stores mature spermatozoa until ejaculation, is densely innervated by sympathetic postganglionic fibers that release noradrenaline to contract epididymal smooth muscle via activation of α_1 -ARs. The smooth muscle contractions have an important role for the adequate transport of spermatozoa within the epididymal duct, as well as for distal CE contraction during the seminal emission phase of ejaculation. It was recently shown that epididymitis, the inflammatory condition of the epididymis, induces acceleration of the sperm transit time in the rat epididymis. We hypothesize that this epididymitis-induced sperm transit time acceleration is due to changes in the contractility of the epididymal duct. Thus, the aim of this study was to investigate the α_1 -ARs-mediated contraction of the distal CE in an experimental model of acute epididymitis in rats induced by lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli*. Contraction studies indicated that the potency of noradrenaline increased ~6-fold in the inflamed distal CE at 6 h post-intravasal LPS injection. Noradrenaline-induced contractions were competitively antagonized by prazosin, a non-selective α_1 -ARs antagonist, with similar affinities in both LPS- and saline-treated groups ($pA_2 \approx 8.9$). However, the potency of BMY 7378, a selective α_{1D} -ARs antagonist, was ~50-fold higher in the distal CE treated with LPS ($pA_2_{LPS} = 8.70$ vs $pA_2_{Sal} = 6.95$), yielding a Schild slope less than unity. Furthermore buspirone, a selective α_{1D} -ARs agonist, was ~3-fold more potent in the LPS-treated group ($pEC_{50_{LPS}} = 4.93$ vs $pEC_{50_{Sal}} = 4.36$) and the concentration-response curves (CRCs) for this agonist was antagonized by BMY 7378, with estimated potency of ~8.70, consistent with α_{1D} -AR participation. Supporting these findings, in segments of distal CE incubated with LPS (300 ng/ml) for 4 h *in vitro*, BMY 7378 potentially antagonized the noradrenaline-induced contractions, yielding a $pA_2 \approx 8.50$. Moreover, oxymetazoline (α_{1A} partial agonist) was ~6-fold less potent in segments exposed to LPS in comparison to its control ($pEC_{50_{LPS}} = 6.22$ vs $pEC_{50_{Sal}} = 7.00$). Interestingly, in tissues that were pre-incubated with PDTC, an inhibitor of NF κ B,

prior to challenge with LPS, low concentration of BMY 7378 was ineffective in displace the CRCs for noradrenaline. RT-qPCR assays indicated that the relative levels of transcripts for α_{1a} -, α_{1b} - and α_{1d} -ARs were not changed in the distal CE with in vivo epididymitis. Inhibition curves of the specific binding of [^{3} H]-Prazosin to selective ligands were performed. Despite the comparable results for prazosin and BMY 7378, low affinity sites for RS 100329 (a selective α_{1A} ligand) were identified, suggesting an increase of the α_{1D} -ARs population in inflamed distal CE. In conclusion, LPS-induced epididymitis changed the functional α_1 -AR subtype in the smooth muscle of the distal CE, resulting in a heterogeneous population of receptors (α_{1A} - and α_{1D} -ARs) involved in the contractile response during acute inflammation. The co-participation of α_{1D} -ARs is correlated with noradrenaline super-sensitivity in inflamed distal CE, and seems to depend on the NF κ B signaling pathway. This change may concur to increase the ductal constriction, thereby avoiding the ascent of bacteria to proximal regions of the epididymis. However, it may contribute to the acceleration of sperm transit in the epididymis, an event associated with poor sperm maturation outcomes.

Keywords: alpha-1 adrenoceptors; epididymitis; contraction; smooth muscle.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[³H]-Prazosin: ligante prazosin radioativamente marcado com trício

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

CCR: curva concentração-resposta

CE: cauda do epidídimo

CE distal: região distal da cauda do epidídimo

CR: *concentration ratio*

E_{max}: resposta máxima

ERK: kinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)

GRK: quinase de receptores acoplados à proteína G

HEK cells: células de rim embrionário humano

IL-1 β : interleucina 1 beta, uma interleucina pró-inflamatória

IP₃: inositol trisfosfato

IBB: Instituto de Biociências de Botucatu

MAPK: proteína kinase ativada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)

NFKB: nuclear factor-kappaB

PDTC: pirrolidina ditiocarbamato

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

TLRs: Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O epidídimo	13
1.2 Epididimite	18
1.3 Os adrenocetores- α_1 (α_1 -ARs).....	23
1.4 Envolvimento de α_1 -ARs na fisiologia do epidídimo	26
2. HIPÓTESE	28
3. OBJETIVO GERAL.....	29
3.1 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Resumo experimental.....	30
4.2 Animais.....	31
4.3 Epididimite <i>in vivo</i>	32
4.3.1 Dissecção da região distal da cauda do epidídimo	32
4.3.2 Validação da epididimite <i>in vivo</i>	33
4.3.3 Ensaios de transcriptase reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	34
4.3.4 Experimentos de ligação do radioligante [^{3} H]-Prazosin em segmentos da cauda do epidídimo	35
4.3.5 Experimento funcional farmacológico	37
4.4 Parâmetros farmacológicos avaliados	39
4.5 Exposição da CE distal ao LPS <i>in vitro</i>	41
4.6 Drogas e reagentes	41
5. RESULTADOS	43
5.1 Validação do modelo de epididimite <i>in vivo</i> induzida pela injeção intraductal de LPS de <i>E. coli</i>	43
5.2 Avaliação do subtipo de α_1 -ARs funcional na contração à noradrenalina exógena em CE distal de rato com epididimite <i>in vivo</i>	45
5.2.1 Avaliação da participação dos α_{1D} -ARs na contração da CE distal inflamada pela buspirona	54
5.3 Avaliação da contração mediada por α_1 -ARs após a exposição <i>in vitro</i> de segmento da CE distal ao LPS	56
5.4 Avaliação da expressão relativa de transcritos de α_1 -ARs na CE distal de rato com epididimite <i>in vivo</i>	60
5.5 Avaliação da expressão de α_1 -ARs na CE distal por experimento de binding	61
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 O epidídimo

No testículo, túbulos seminíferos convergem para formar a *rete testis*, que, por sua vez, direciona-se aos ductulos eferentes, que recebem os espermatozoides recém-saídos do testículo. Dos ductulos eferentes, os espermatozoides são transportados para o epidídimo. Este é um órgão acessório do sistema reprodutor masculino formado por um ducto longo e altamente enovelado que liga os ductulos eferentes ao ducto deferente. Com base em características anatômicas e morfológicas, o epidídimo pode ser dividido em diferentes regiões, conforme a espécie analisada. Em roedores, por exemplo, o epidídimo é classicamente dividido nas regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Figura 1A) (Robaire *et al.*, 2006).

O epidídimo apresenta quatro compartimentos principais: 1) luz tubular, que contém o fluído luminal e os espermatozoides; 2) epitélio pseudoestratificado composto por diferentes tipos celulares cuja abundância varia ao longo do órgão; 3) músculo liso, que envolve o epitélio em toda a extensão do órgão; e 4) interstício, que contém vasos sanguíneos e linfáticos, além de diferentes tipos de células de origem imunológica ou não (Robaire *et al.*, 2015). O epitélio epididimário é formado por diversos tipos celulares, denominadas células principais, células basais, células apicais, células estreitas, células claras, além de células de origem imunológica, como as células halo e células dendríticas, cuja distribuição varia ao longo do órgão, conferindo ao epidídimo grande complexidade estrutural e funcional (Cornwall, 2009; Da Silva *et al.*, 2011). Contribuindo ainda mais para tal complexidade, cada região do epidídimo pode ser subdividida em segmentos separados por septos intersticiais de tecido conjuntivo, apontando a presença de 10 e 19 segmentos no epidídimo de camundongos e ratos, respectivamente (Turner *et al.* 2007, Turner, 2008). A análise da expressão gênica por microarray revelou diferenças na expressão de uma série de genes entre os diferentes segmentos epididimários (Jelinsky *et al.*, 2007). Essa observação sustenta a hipótese de que

a compartimentalização da expressão gênica entre os segmentos epididimários promove variações na atividade secretória e absorviva do epitélio, gerando microambientes luminiais únicos que gradativamente interagem com os espermatozoides, promovendo sua maturação e culminando no seu armazenamento, em estado quiescente, nas porções distais desse órgão (Belleannée *et al.*, 2012).

Na idade adulta, o ducto epididimário quando desenovelado atinge aproximadamente 6 m no homem, 3 m no rato e 1 m no camundongo (Robaire *et al.*, 2006). Ao deixar o testículo, o espermatozoide funcionalmente imaturo é transportado ao longo do ducto epididimário (10-14 dias) em um ambiente especializado para tornar-se maduro e adquirir motilidade e habilidade fértil (Hinton *et al.*, 1995; Turner, 1995; Ricker, 1998; Avellar *et al.*, 2018). Além de promover a maturação do gameta masculino, o epidídimo também é essencial para o seu transporte, concentração, armazenamento e proteção previamente à ejaculação. Vale destacar, neste ponto, que os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares pelos quais o epidídimo exerce suas funções ainda permanecem pouco conhecidos. A importância de se investigar os processos epididimários responsáveis pela geração de espermatozoides competentes é enfatizada pelo fato de que quase metade dos casos de infertilidade masculina ainda não apresentam causas conhecidas, sendo que muitos podem estar associados a alterações durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo (Turner, 2008; Cornwall, 2009).

Durante esse processo de maturação, o transporte de espermatozoides pelo epidídimo depende de contrações da musculatura lisa ao redor do ducto epididimário (Avellar *et al.*, 2018), que na maior parte das regiões do epidídimo, são rítmicas. Já na cauda do epidídimo (CE), região onde os espermatozoides maduros são estocados até o momento da ejaculação (Robaire *et al.*, 2006), as contrações são esporádicas na ausência de estímulos, como aqueles provenientes do sistema nervoso autônomo (Elfgen *et al.*, 2018). Tanto a espessura da camada muscular lisa que circunda as células epiteliais do epidídimo quanto a densidade da inervação autonômica aumentam do epidídimo proximal (segmento inicial/cabeça) para o distal (cauda) (Ricker, 1998) (Figura 1B), enfatizando a maior importância da contração da

musculatura lisa epididimária para o transporte do espermatozoide nas regiões mais distais do órgão. Assim, a delicada, precisa e coordenada regulação da função do músculo liso representa um pré-requisito para a maturação do espermatozoide e, conseqüentemente, para a fertilidade masculina (Ricker *et al.*, 1997).

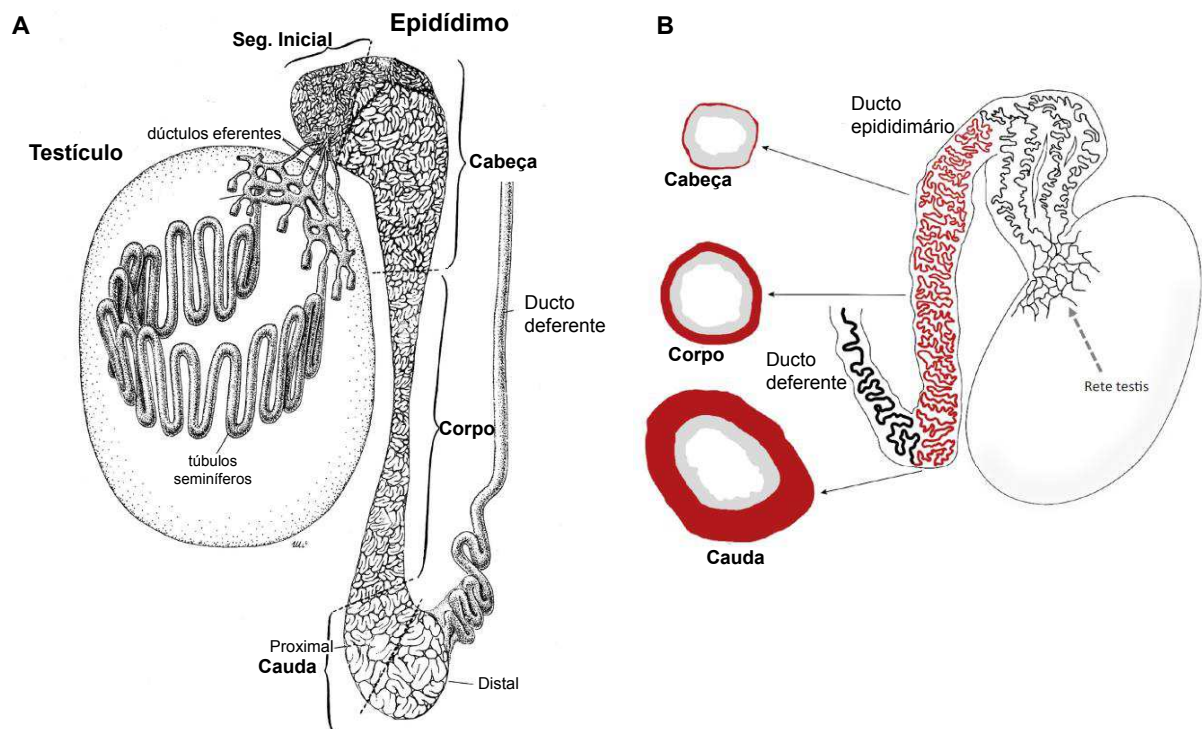


Figura 1 – Representação esquemática das estruturas do epidídimo. (A) Testículo, ductos eferentes, epidídimo e suas principais regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda proximal e distal). Adaptado de: (Robaire *et al.*, 2006). (B) ilustração do ducto epididimário humano (vermelho) com suas estruturas vizinhas e a espessura crescente da camada de músculo liso ao longo do ducto (Elfgen *et al.*, 2018).

Estudos anatômicos determinaram que o epidídimo, em especial, suas regiões distais, recebe inervação pós-ganglionar autonômica oriunda de diferentes glândrios e plexos (Ricker, 1998). Fibras do nervo hipogástrico (NH) emergem da integração entre o gânglio mesentérico inferior (GMI), gânglio pélvico principal (GPP) e gânglio pélvico acessório (GPA), fornecendo a inervação simpática para as regiões distais do epidídimo (Figura 2). Do plexo hipogástrico origina-se uma densa rede de axônios simpáticos que inervam células musculares (Anton *et*

al., 1977; Kolbeck *et al.*, 1993; Ricker, 1998) e controlam a contração via liberação do neurotransmissor noradrenalina e do co-transmissor ATP (Ventura *et al.*, 1991). Além das fibras autonômicas pós-ganglionares simpáticas, o epidídimo também é innervado por fibras parassimpáticas, de natureza colinérgica, e por fibras não-colinérgicas e não-adrenérgicas (Lamano Carvalho *et al.*, 1986; Kempinas *et al.*, 1998b; Ricker, 1998; Silva *et al.*, 2002).

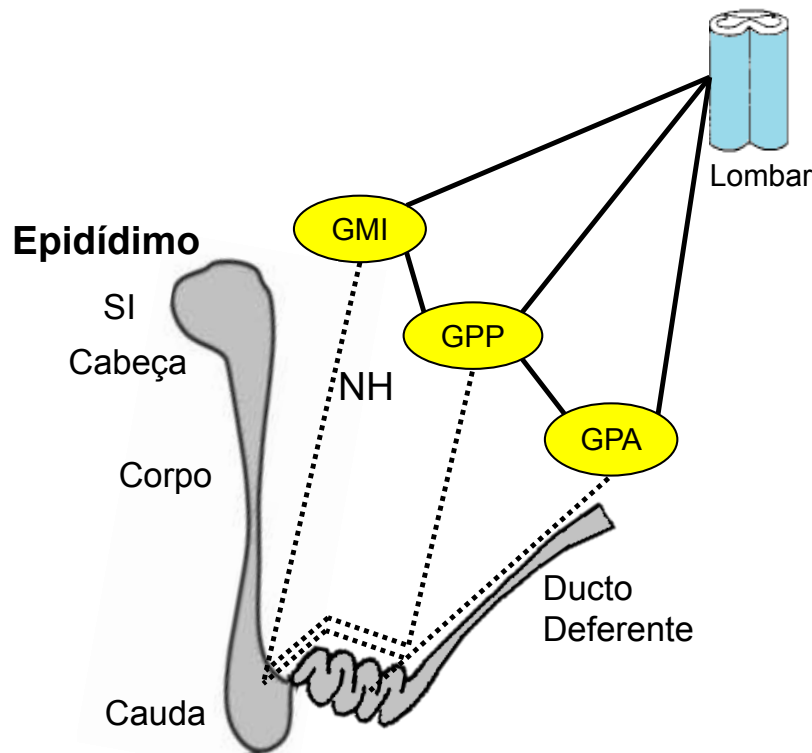


Figura 2 – Esquema de inervação da cauda do epidídimo (CE) e ducto deferente (DD). Fibras pré-ganglionares simpáticas emergem das regiões lombares da medula espinhal conectando-se com o gânglio mesentérico inferior (GMI ou IMG), de onde emerge o nervo hipogástrico (NH) que fornece a inervação simpática predominante na CE. Inervação adicional é derivada do gânglio pélvico principal (GPP ou MPG), de onde emanam fibras para inervar regiões proximais do DD antes de continuar para o epidídimo distal. Fibras do gânglio pélvico acessório (GPA ou PAG) localizadas próximas à base do ducto deferente (DD), e cursa o DD antes de terminar na cauda do epidídimo (Ricker, 1998). Nervos hipogástricos também se estendem para se conectar com o GPP e, deste, emergem nervos que se estendem para se conectar ao GPA. (Kolbeck e Steers, 1993; Ricker, 1998). Linhas pontilhadas (---) representam fibras innervando o epidídimo.

A regulação das funções do epidídimo ocorre graças a uma complexa rede de fatores hormonais, neuronais, lumícrinos e imunológicos (Robaire *et al.*, 2006). Dentre estes, os androgênicos, testosterona e seu metabólito ativo diidrotestosterona (DHT), são os mais relevantes fatores para o desenvolvimento do epidídimo e a manutenção de suas funções no indivíduo adulto para revisão ver (Patrão *et al.*, 2009). Estudos em ratos demonstraram que

as concentrações teciduais de androgênios variam ao longo do epidídimo (Turner *et al.*, 1985). No epidídimo de humanos e roedores, receptores de androgênios (AR) são encontrados principalmente nas regiões nuclear e perinuclear de células epiteliais, intersticiais e da musculatura lisa que envolve o epitélio epididimário e vasos sanguíneos (para revisão ver Patrão *et al.* (2009)). A redução dos níveis plasmáticos e teciduais de androgênios, como aquela observada na castração cirúrgica, promove alterações na estrutura e no padrão de expressão gênica no epidídimo (Robaire *et al.*, 2007). Por exemplo, a expressão de genes que codificam GPCRs, como o adrenoceptor- α_{1A} (α_{1A} -AR) e receptores colinérgicos muscarínicos, que estão envolvidos na regulação autonômica da função do epidídimo é regulada por androgênios neste órgão (Queiróz *et al.*, 2002; Maróstica *et al.*, 2005).

O impacto da interação entre o epidídimo e os sistemas imunológicos inato e adaptativo na fertilidade masculina é um ponto que merece destaque. O estabelecimento da tolerância imunológica acontece antes da geração do gameta maduro que, portanto, é considerado corpo estranho pelo sistema imunológico do indivíduo. Dessa forma, os espermatozoides são células auto-antigênicas, sendo capazes de induzir resposta autoimune e inflamatória (Hedger *et al.*, 2006). Apesar desse *status* imunológico, os espermatozoides são tolerados durante sua jornada pelo epidídimo, o que sugere a existência de mecanismos de tolerância imunológica, responsáveis por prevenir que os gametas em maturação sejam atacados pelo sistema imunológico. Interessantemente, o epidídimo expressa de forma constitutiva um arsenal de defesa variado, composto por diversas proteínas antimicrobianas e outros elementos do sistema imunológico que atuam na proteção dos espermatozoides e do próprio tecido contra ameaças infecciosas e inflamatórias (para revisão ver Hall *et al.* (2002) e Hedger (2011)). É reconhecido que qualquer desequilíbrio entre os processos pró- e anti-inflamatório no epidídimo pode comprometer a sua função e, conseqüentemente, a fertilidade. Embora uma proporção significativa dos casos de infertilidade masculina seja, de fato, atribuída a causas inflamatórias ou imunológicas (Hedger, 2011), os mecanismos celulares e moleculares básicos envolvidos na resposta do epidídimo em condições de inflamação ainda são pouco conhecidos. Nesse ponto, vale destacar que doenças

inflamatórias do epidídimo são altamente prevalentes em homens de todas as idades (Nicholson *et al.*, 2010; Pilatz *et al.*, 2015), enfatizando a necessidade de se conhecer melhor aspectos farmacológicos do epidídimo em condições de inflamação.

1.2 Epididimite

A epididimite (inflamação do epidídimo), na sua forma aguda, é uma condição patológica predominantemente causada por bactérias que ascendem pelo trato urinário, ducto deferente até atingir e colonizar o epidídimo (Pilatz *et al.*, 2015). Como sintomas, o paciente apresenta dor, eritema e inchaço escrotal. As bactérias Gram-negativas *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Escherichia coli* são os agentes etiológicos mais comuns (Trojian *et al.*, 2009; Michel *et al.*, 2015). Trata-se do 5º diagnóstico urológico mais comum em homens com idades entre 18 e 50 anos (Tracy *et al.*, 2008). Em um levantamento epidemiológico no Reino Unido, em 2004 a epididimite teve prevalência, com 28 casos/10.000 homens-ano, decaindo para 21 casos/10.000 homens-ano em 2007 (Nicholson *et al.*, 2010), e uma incidência de 600.000 casos por ano nos Estados Unidos (Trojian *et al.*, 2009). Apesar da efetividade do tratamento com antibióticos e anti-inflamatórios, as sequelas da epididimite aguda podem prejudicar severamente a fertilidade e induzir astenozoospermia¹, com oligozoospermia² ou azoospermia³ em até 40% dos casos (Haidl *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2015).

Na infecção, a inflamação e a resposta imune inata são disparadas no hospedeiro por reconhecimento de motivos específicos de patógeno, conhecidos como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos, *pathogen-associated molecular patterns*). Sabe-se que os PAMPs interagem com um grupo de receptores conhecido como PRRs (receptores de reconhecimento de padrões, *pattern recognition receptors*), presentes em células imunológicas e não imunológicas (Kato *et al.*, 2016). Dentre os PRRs, os mais estudados são

¹ Redução ou ausência da mobilidade dos espermatozoides.

² Redução do número de espermatozoides no ejaculado.

³ Ausência total de espermatozoides no ejaculado.

os receptores do tipo-*Toll* (TLRs), uma família de receptores transmembranares que desempenham um papel crítico na detecção e resposta a patógenos invasores como bactérias, vírus, fungos e parasitas (Kawai *et al.*, 2010). Até o momento 13 TLRs foram clonados em mamíferos, dos quais 11 estão presentes em humanos. A expressão abundante e constitutiva de diversos TLRs já foi observada no epidídimo de ratos e camundongos (Palladino *et al.*, 2007; Hedger, 2011). De modo geral, os TLRs1-9 são abundantemente expressos no epidídimo, enquanto para TLR10 e TLR11 são menos abundantes (Palladino *et al.*, 2007; Palladino *et al.*, 2008). No epidídimo de roedores, expressão de diferentes TLRs, incluindo TLR2, TLR3 e TLR4, foi detectada em células epiteliais, intersticiais, da musculatura lisa e em espermatozoides (Palladino *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016).

O TLR4 foi o primeiro membro descoberto dessa família de receptores, apresentando papel essencial na detecção e disparo de resposta imunológica contra infecção por bactérias Gram-negativas, via interação com lipopolissacarídeo (LPS), localizado na parede celular dessas. O LPS é um PAMP bem caracterizado, com uma estrutura composta por três regiões (Figura 3A): 1) Lipídio A (endotoxina), que ancora o LPS na membrana externa da bactéria; 2) um núcleo polissacarídeo que se liga ao lipídio A pelo KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico); 3) Antígeno-O, que consiste em unidades de repetição de oligossacarídeos (Figura 3A) (Maeshima *et al.*, 2013). O lipídio A contém duas glicosaminas fosforiladas ligadas a 6 cadeias lipídicas, que consiste no componente responsável pela atividade antigênica da endotoxina, ou seja, é o padrão molecular conservado responsável pela indução da resposta ao LPS (Raetz *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2009). As 6 cadeias lipídicas promovem forte resposta inflamatória, enquanto aqueles com lipídio A com 5 cadeias lipídicas são ~100 vezes menos ativos; já aqueles com 4 lipídios, como o Eritoran, não apresentam atividade e comporta-se como antagonista, ligando-se competitivamente ao TLR4-MD2 (descrito abaixo) e inibindo o LPS de iniciar uma resposta inflamatória (Park *et al.*, 2009). No lipídio A, os dois grupos fosfatos (diglicosamina 1,4'-bis-fosforilada) também são importantes para sua atividade

agonista, uma vez que a deleção desses grupamentos reduziu a atividade endotóxica do LPS (Rietschel *et al.*, 1993; Ohto *et al.*, 2012).

O reconhecimento do LPS pelo TLR4 requer o envolvimento de proteínas acessórias (Figura 3B). O LPS interage com a proteína de ligação do LPS (LBP) solúvel, que é uma proteína de transporte e que facilita a associação do LPS ao CD14. A proteína CD14 facilita a transferência do LPS ao complexo TLR4 / MD-2, modulando o reconhecimento do LPS. A proteína MD-2 é um co-receptor especializado na interação lipídica e que interage com TLR4, provavelmente porque o LPS com suas 6 cadeias lipídicas é grande demais para interagir diretamente com o TLR4 (Lu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 2010). A ativação do TLR4 (complexo LPS/MD-2/TLR4) leva à dimerização dos domínios extracelulares do receptor, disparando uma cascata de sinalização intracelular. Proteínas adaptadoras no domínio intracelular, como TIRAP, MyD88, TRAM, TRIF, são recrutadas, dando início a dois tipos de sinalização, a via dependente da proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e a via independente de MyD88 (ou TRIF-dependente) (Figura 3B). A via dependente de MyD88 é responsável pela ativação de fatores de transcrição como o NFkB e AP1, levando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , enquanto a via independente de MyD88 promove ativação de fatores de transcrição envolvidos com respostas antivirais, como o IRF3, e ativação tardia de NFkB (Lu *et al.*, 2008).

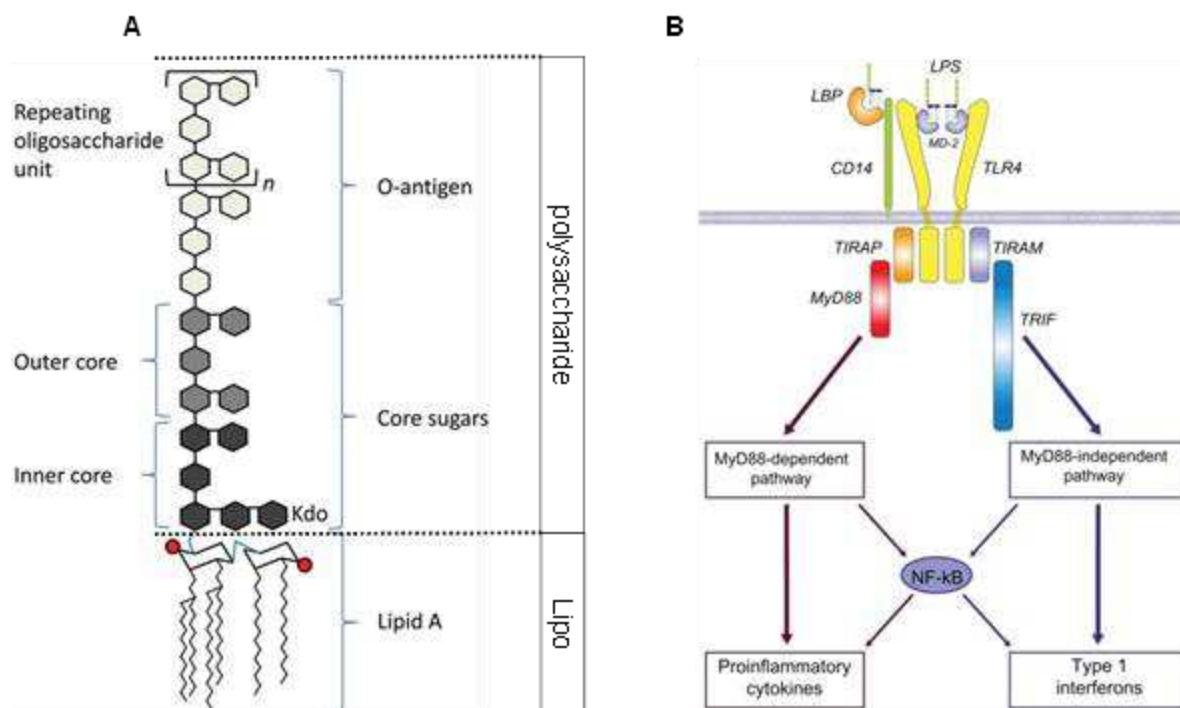


Figura 3 – Esquema ilustrativo da estrutura do LPS e da sinalização TLR4/LPS. **A)** Estrutura básica do lipopolissacarídeo (LPS). O LPS consiste de três regiões: i) o lipídio A, contendo 6 cadeias lipídicas (● indica grupo fosfato); ii) núcleo polissacarídeo ligado ao lipídio A por moléculas de KDO; iii) O-antígeno, que consiste em um polissacarídeo de unidades repetidas (denotadas com um “n”). Adaptado de Maeshima *et al.* (2013). **B)** Visão geral da sinalização do receptor TLR4 após o reconhecimento do complexo MD-2/LPS. A sinalização pode ser separada em vias dependentes e independentes de MyD88 (Lu *et al.*, 2008).

Estudos com modelos experimentais e amostras de epidídimo obtidas de homens submetidos à epididimectomia revelaram que a epididimite induz uma série de alterações histopatológicas e funcionais no órgão (Michel *et al.*, 2015; Michel *et al.*, 2016). Em camundongos com epididimite induzida por injeção retrógrada da bactéria uropatogênica *E. coli* (UPEC) houve remodelamento fibrótico do epidídimo acompanhado do aumento da expressão da citocina pró-fibrótica da activina A, sugerindo que o remodelamento fibrótico que ocorre em humanos também dependem do aumento da expressão dessa citocina (Michel *et al.*, 2016). Adicionalmente, a incubação do epidídimo com activina A também induziu fibrose em cultura de cauda do epidídimo, a qual foi inibida pela folistatina (proteína de ligação a activina que neutraliza as ações da activina), sugerindo que esse dano fibrótico parece ser em grande parte atribuível à gravidade da resposta inflamatória à infecção, mais do que à própria infecção (Michel *et al.*, 2016). A UPEC causou fibrose e obstrução do ducto na CE,

com presença de espessamento da camada muscular lisa ao redor o ducto (Michel *et al.*, 2016). Stammer *et al.* (2015) observaram semelhante alteração obstrutiva em humanos com epididimite crônica, e, em modelo de injeção de UPEC em camundongos, demonstraram um espessamento e espaçamento da camada de músculo liso e uma diminuição do diâmetro da luz do ducto.

Modelos experimentais de epididimite são utilizados com o propósito de mimetizar e reproduzir a epididimite infecciosa. Um dos modelos animais utilizados consiste na injeção retrógrada de endotoxinas purificadas derivadas de bactérias, como LPS (agonista TLR4) diretamente no lúmen do ducto deferente (Michel *et al.*, 2015; Fijak *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018) ou por via intravenosa (Rodrigues *et al.*, 2008). Para o desenvolvimento desta tese, foi utilizado o modelo de injeção retrógrada de LPS no lúmen do ducto deferente, levando em consideração a capacidade do LPS em ativar seletivamente o TLR4 e, consequentemente, dispara as cascatas inflamatórias dependentes deste receptor, o que faz deste PAMP uma ferramenta útil para entender a fisiopatologia da epididimite bacteriana.

Em estudo prévio explorando esse modelo de epididimite para estudar as respostas locais da inflamação aguda, Silva *et al.* (2018) revelaram que 1, 7 e 14 dias após o tratamento com LPS ocorre aceleração do trânsito espermático na CE, indicando um efeito drástico e duradouro, e sugerindo que alterações na contratilidade poderiam exercer um papel nessa aceleração no trânsito. Além disso, esse mesmo estudo observou que 6 h após a injeção intraductal de LPS, vários mediadores inflamatórios (como *Il1b*, *Tnf*, *Il6*) estão elevados.

Apesar dos avanços no entendimento estrutural e fisiológico do epidídimo, bem como dos aspectos fisiopatológicos da epididimite, informações sobre a contratilidade da camada muscular lisa do epidídimo e suas possíveis alterações na epididimite são quase ausentes, a despeito da importância da contratilidade da musculatura lisa deste órgão para o transporte e maturação do espermatozoide e, consequentemente, para a geração de um ejaculado fértil. Uma vez que a contratilidade do epidídimo é controlada pelo sistema nervoso autônomo simpático, o qual libera noradrenalina que tem como alvo α_1 -ARs localizados no músculo liso, estes receptores assumem um papel relevante na fisiologia e fisiopatologia do epidídimo.

1.3 Os adrenoceptores- α_1 (α_1 -ARs)

Os α_1 -ARs são receptores para o neurotransmissor autonômico e central noradrenalina (NA) e para o hormônio adrenalina, pertencentes à grande família de Receptores Acoplados à Proteína G (GPCR – *G-Protein Coupled Receptors*). Os α_1 -ARs encontram-se amplamente distribuídos pelo organismo. Existem três subtipos, denominados α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -ARs e codificados por genes diferentes (Hieble *et al.*, 1995; Docherty, 1998; Langer, 1999; Docherty, 2010; Akinaga *et al.*, 2019). Um quarto subtipo de α_1 -AR foi reportado, o α_{1L} -AR, em razão de sua baixa afinidade pelo prazosin (antagonista de α_1 -AR não seletivo); porém camundongos knockouts para α_{1A} -ARs sugerem que o α_{1L} -AR é uma variante fenotípica do α_{1A} -AR (Gray *et al.*, 2008).

Os α_1 -ARs acoplam-se preferencialmente à proteína $G_{q/11}$ que, uma vez ativados, levam à ativação da fosfolipase $C\beta$ ($PLC\beta$) e hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato à diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). O IP_3 liga-se a receptores no retículo endoplasmático, promovendo liberação de Ca^{2+} intracelular para o citosol. De modo sinérgico, o Ca^{2+} atua com o DAG para ativar a proteína kinase C que, por sua vez, leva à ativação dos membros ERK 1/2 da família MAPK, mediando a divisão e diferenciação celular (Minneman, 1988; Wu *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2011) (Figura 4).

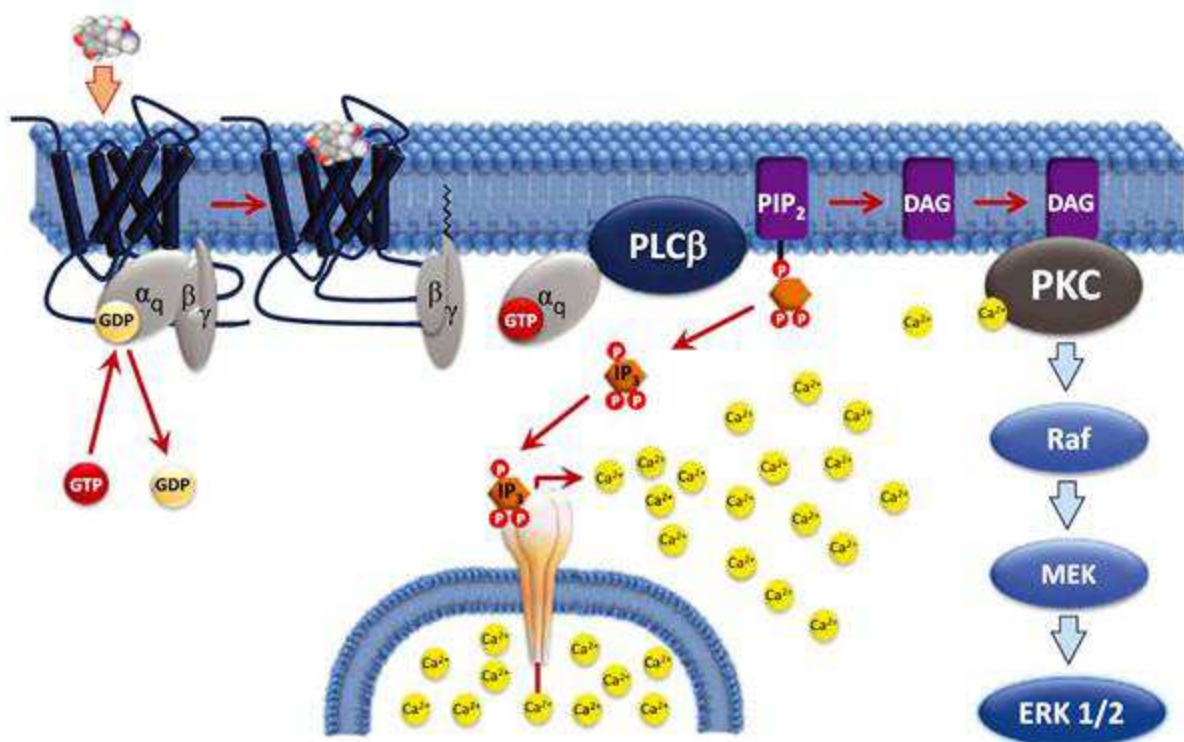


Figura 4 – Representação esquemática da via de sinalização clássica de uma proteína Gq ativada pelos subtipos de α_1 -ARs. O receptor ativado pelo agonista ativa a proteína Gq heterotrimérica que, por sua vez, aciona a via fosfolipase C / IP₃ / Ca²⁺ / DAG / PKC. Fonte: Akinaga *et al.* (2019)

No ser humano, os genes que codificam os α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -ARs (denominados *ADRA1A*, *ADRA1B* e *ADRA1D*) estão localizados nos cromossomos 8, 5 e 20 (Hieble *et al.*, 1995; Hawrylyshyn *et al.*, 2004) e codificam proteínas de 466, 519 e 572 aminoácidos, respectivamente. No rato, os genes que codificam *Adra1a*, *Adra1b* e *Adra1d* estão localizados nos cromossomos 15, 10 e 3 e codificam proteínas de 466, 514 e 561, respectivamente (guidetopharmacology: [alpha1a](http://www.guidetopharmacology.org), [alpha1b](http://www.guidetopharmacology.org), [alpha1d](http://www.guidetopharmacology.org). Disponível em: <http://www.guidetopharmacology.org>).

A frequente co-expressão dos três subtipos de α_1 -ARs na maioria dos tecidos confere certa redundância em respostas biológicas, e tal redundância continua um assunto pouco esclarecido (Akinaga *et al.*, 2019). Em outras palavras, alguns órgãos compostos pelo menos em parte por músculos lisos expressam os três subtipos de α_1 -AR, enquanto que a resposta contrátil é mediada predominantemente por apenas um deles. Por exemplo, na CE de rato, ensaios de binding com [³H]-Prazosin e de RT-PCR indicam a presença dos 3 subtipos de α_1 -

ARs (Queiroz *et al.*, 2002), enquanto que o subtipo responsável pela contração à noradrenalina é o α_{1A} -ARs (Pacini *et al.*, 2018). Semelhante padrão também é descrito para ducto deferente (Burt *et al.*, 1995; Pupo, 1998; Yono *et al.*, 2008), próstata (Faure *et al.*, 1994a; Faure *et al.*, 1994b; Forray *et al.*, 1994) e vesícula seminal (Shima, 1993; Yono *et al.*, 2008). A artéria aorta expressa os 3 subtipos, porém o α_{1D} -AR é responsável por mediar a contração (Piascik *et al.*, 1995; Villalobos-Molina *et al.*, 1996; Pupo *et al.*, 1999; Morais *et al.*, 2002; Nojimoto *et al.*, 2010), e, similarmente, o baço expressa os 3 subtipos, enquanto a contração é mediada pelo subtipo α_{1B} (Aboud *et al.*, 1993; Burt *et al.*, 1995; Eltze, 1996; Mueller *et al.*, 2005). Neste sentido, a farmacologia tem papel fundamental na identificação da participação dos subtipos de α_1 -ARs nas funções fisiológicas ao prover as ferramentas e o racional adequado para tanto; tais ferramentas são ligantes que se comportam como agonistas ou antagonistas suficientemente seletivos para discriminar subtipos de α_1 -ARs. Na Tabela 1, estão listados alguns desses ligantes considerando suas seletividades para determinado subtipo de α_1 -ARs.

Tabela 1 – Ligantes seletivos para α_1 -ARs

Ligante	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Agonista	Oximetazolina*		Buspirona*
	A-61603		
Antagonista	WB-4101	L-765,314	BMY 7378*
	5-metil-urapidil	AH11110A	
	RS 100329*		

(Calzada *et al.*, 2001). * indica ligantes utilizados na presente tese.

No contexto do sistema reprodutor masculino, durante a fase de emissão do ejaculado, o sistema nervoso simpático libera noradrenalina e o ATP, produzindo contrações da musculatura lisa dos epidídimos, ductos deferentes, vesículas seminais, uretra e próstata, propelindo o sêmen em direção ao meato da uretra. Conforme mencionado anteriormente, em muitos desses órgãos do sistema geniturinário, contrações à noradrenalina são

primordialmente mediadas pelos α_{1A} -ARs (para revisão ver Akinaga *et al.* (2019). No epidídimo, os α_1 -ARs desempenham importante papel na fertilidade, que será descrito na próxima seção.

1.4 Envolvimento de α_1 -ARs na fisiologia do epidídimo

Durante a fase de emissão da ejaculação, os espermatozoides maduros estocados na CE são propelidos em direção ao ducto deferente (Hib *et al.*, 1982). A CE recebe densa inervação autonômica (Mitchell, 1935) e é sabido que as respostas contráteis da CE são mediadas essencialmente pela noradrenalina e ATP liberados das terminações nervosas, e que os α_1 -ARs e purinoceptores-P2X estão presentes na pós-sinapse (Ventura *et al.*, 1991; Ricker *et al.*, 1997). A contração da CE é determinante para produção de um ejaculado fértil, uma vez que a alteração dessa ação coordenada pode comprometer a fertilidade (Solomon *et al.*, 1997; Kempinas *et al.*, 1998a). Camundongos nocaute para α_{1A} -ARs apresentam redução de 50% na taxa de fertilidade, enquanto que camundongos nocaute para todos os 3 subtipos de α_1 -ARs são inférteis devido ao severo comprometimento da ejaculação causado pela perda da contratilidade, sem efeito aparente sobre a motilidade espermática e capacidade de fertilização do espermatozoide isolado da cauda do epidídimo (Sanbe *et al.*, 2007). Mais ainda, camundongos duplo-nocautes para α_{1A} -ARs e purinoceptores P2X1 também são inférteis (White *et al.*, 2013). Tal infertilidade não resulta de prejuízos na espermatogênese ou na qualidade espermática, já que os espermatozoides recuperados das caudas dos epidídimos foram capazes de fertilizar oócito *in vitro* e estavam em números semelhantes e com motilidade similar aos do animal parental selvagem (wild type). O fenótipo de infertilidade resultou da falta de contratilidade da musculatura lisa, sugerindo que o purinoceptor P2X1 e o α_{1A} -AR são potenciais alvos para um contraceptivo masculino não-hormonal (White *et al.*, 2013).

É sabido que mudanças hormonais, injúrias nervosas químicas ou mecânicas levam a alterações na expressão de subtipos de α_1 -ARs e de outros GPCRs, indicando que há importante plasticidade no padrão de expressão desses receptores, supostamente com papel adaptativo. Por exemplo, a castração cirúrgica ou química de ratos altera a expressão e função dos α_1 -ARs do ducto deferente de ratos (Pupo, 1998; Moraes *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003), e a simpatectomia química com reserpina modula de forma diferencial a expressão e a função dos α_1 -ARs da artéria caudal de ratos (Kamikihara *et al.*, 2005; Kamikihara *et al.*, 2007). Interessantemente, a desnervação química com guanetidina afetou a contratilidade do epidídimo, promovendo atraso no trânsito espermático na CE (Kempinas *et al.*, 1998b). Vale destacar nesse contexto que o tempo de trânsito tem um importante papel na maturação do espermatozoide, e alterações na contratilidade podem afetar esse tempo, prejudicando a maturação (Fernandez *et al.*, 2008).

Uma das proteínas que modula a responsividade GPCRs é a quinase ligada à receptores acoplados à proteína G (GRK). As GRKs fosforilam o receptor ocupado pelo agonista e as arrestinas ligam-se ao receptor fosforilado, promovendo internalização do receptor ou desacoplando-o da Proteína G (Lefkowitz, 2004). Foi observado que a inflamação diminui a expressão de GRK2, contribuindo para um aumento na excitabilidade neuronal e, dessa forma, para alodinia (mudança no sentido da dor) (Kleibeuker *et al.*, 2007). Por outro lado, a ativação de receptor TLR4 em macrófagos de camundongos aumentou a expressão de GRK2 (Loniewski *et al.*, 2008), mostrando que a relação entre GPCR e possível modulação decorrente de inflamatório ainda é controverso.

Nesse contexto, investigar os α_1 -ARs na epididimite é um passo crítico para o melhor entendimento da fisiopatologia desta doença e do papel da sinalização simpática no epidídimo durante uma resposta inflamatória aguda, bem como para contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que minimizem o comprometimento dessa doença na fertilidade masculina.

2. HIPÓTESE

Considerando que a epididimite induzida pelo LPS de *E. coli* induziu aceleração do tempo de trânsito espermático no epidídimo, neste estudo testamos a hipótese de que este estímulo inflamatório afeta a função dos α_1 -ARs, causando mudanças na contratilidade da musculatura lisa do ducto epididimário e aumento de sua capacidade contrátil a estímulo simpático.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto da epididimite induzida pela injeção intraductal de LPS de *E. coli* sobre a função e expressão dos α_1 -ARs na cauda de epidídimo de ratos para avançar no entendimento dos efeitos da inflamação sobre a contratilidade da musculatura lisa epididimária.

3.1 Objetivos Específicos

- Identificar os subtipos de α_1 -ARs envolvidos na contração da CE distal de ratos com epididimite;
- Quantificar a expressão relativa de transcritos dos 3 subtipos de α_1 -ARs na CE distal de ratos com epididimite;
- Investigar a densidade proteica dos α_1 -ARs na cauda distal do epidídimo de ratos com epididimite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Resumo experimental

De maneira resumida, os seguintes ensaios foram adotados para o desenvolvimento deste trabalho:

(i) Ensaios de contração com agonistas e antagonistas seletivos de α_1 -ARs, a fim de identificar o(s) subtipo(s) de α_1 -ARs envolvidos na contração de segmentos da CE de rato submetidos ao modelo experimental de epididimite induzida pelo LPS;

(ii) Ensaios de RT-qPCR a fim de avaliar a expressão relativa dos transcritos dos 3 subtipos de α_1 -ARs e da GRK2 na CE de ratos submetidos ao modelo experimental de epididimite induzida pelo LPS;

(iii) Ensaios de binding com o radioligante [^{3} H]-Prazosin na presença de ligantes seletivos para avaliar a população de α_1 -ARs na CE de ratos submetidos ao modelo experimental de epididimite induzida pelo LPS;;

(iv) Ensaios de contração com segmentos de CE expostos ao LPS *in vitro*. A reprodução de resultados (*in vivo* X *in vitro*) possibilitou a investigação do papel do NF κ B, por meio da utilização do seu inibidor PDTC, e seu potencial envolvimento na regulação da funcionalidade dos α_1 -ARs.

Um esquema da estratégia experimental é apresentado na Figura 5:

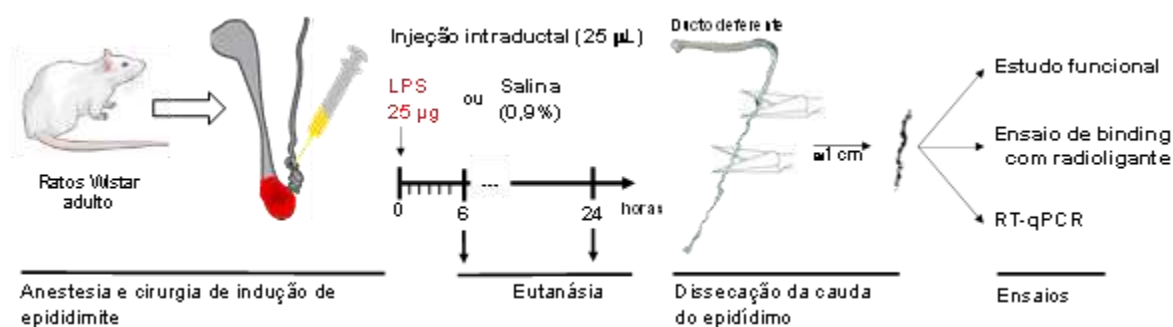
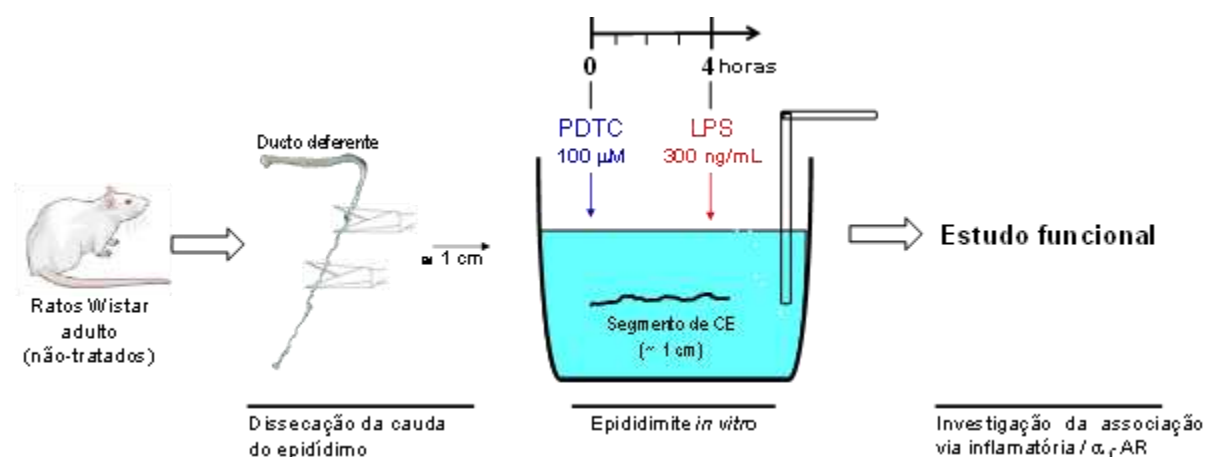
(A) Epididimite *in vivo*(B) Epididimite *in vitro*

Figura 5 – Representação esquemática do delineamento experimental do projeto. A etapa **A** é referente aos tópicos de “(i)-(iii)” e a etapa **B** ao tópico “(iv)” do delineamento experimental.

4.2 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IBB/Unesp sob o protocolo nº 749/2015.

Ratos Wistar machos adultos com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Unesp/Botucatu foram mantidos no Biotério Local do Departamento de Farmacologia até atingirem a fase adulta (90-110 dias). Os ratos foram mantidos em ambiente controlado (temperatura 23-25 °C, ciclo 12 h claro/escuro), com água e ração *ad libitum*, agrupados em 4 animais por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, identificadas e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada.

4.3 Epididimite *in vivo*

Utilizamos o modelo experimental de epididimite induzido pela injeção de LPS na luz do ducto deferente, conforme descrito por Silva *et al.* (2018). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com quetamina (60 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.). As porções epididimárias dos ductos deferentes esquerdo e/ou direito foram expostas por incisão na região escrotal. Em seguida, foram injetados 25 µL de solução salina estéril ou 25 µL de LPS, na luz do ducto deferente, utilizando uma micro-seringa Hamilton® de 100 µL. A injeção foi feita em direção retrógrada, o mais próximo possível da cauda do epidídimo. Em seguida, o órgão foi devolvido ao escroto e a incisão suturada.

Foi selecionado o Lipopolissacarídeo ultrapuro de *E. coli* O55:B5 1 mg/mL (TLRpure®, Innaxon, #IAX-100-013). Preparações ultrapuras de LPS apresentam a vantagem de promover ativação potente e seletiva do TLR4 em concentrações e/ou doses habituais do seu uso, sem a ativação de outros receptores dessa família por contaminantes. De acordo com a especificação do fabricante, estudos *in vitro* demonstraram que até 50 µg/mL o LPS TLRpure® apresenta elevada seletividade pelo TLR4. A dosagem de LPS e o tempo de tratamento foram fundamentadas em estudo prévio por Silva *et al.* (2018), que mostraram que o pico da resposta inflamatória ocorre 6 h após a exposição ao LPS, mimetizando a epididimite aguda.

Os animais foram mortos pelo método de decapitação em guilhotina 6 h ou 24 h após o tratamento, e os grupos que receberam solução salina foram denominados Sal_6h ou Sal_24h, e os que receberam LPS foram denominados LPS25_6h ou LPS25_24h. Animais que não passaram por procedimento cirúrgico foram denominados grupo controle não-operado (C).

4.3.1 Dissecção da região distal da cauda do epidídimo

Por meio de uma incisão do abdômen inferior, os testículos, epidídimos e ductos deferentes (esquerdo e direito) foram isolados. Após identificação das partes do epidídimo, a

CE distal (correspondente à região 19, de acordo com Jelinsky *et al.* (2007) (Figura 6)) foi isolada e congelada em N₂ e mantida em freezer -80 °C até o ensaio de RT-qPCR.

Para estudo funcional e para ensaio de binding, a mesma região da CE distal foi cuidadosamente desenovelada. O tecido foi limpo dos tecidos aderentes e a luz foi lavada com o auxílio de uma seringa de 3 mL e uma agulha 13x4,5 introduzida na extremidade distal. Em seguida, a porção distal da cauda do epidídimo foi cortada em segmentos para os procedimentos experimentais descritos a seguir.

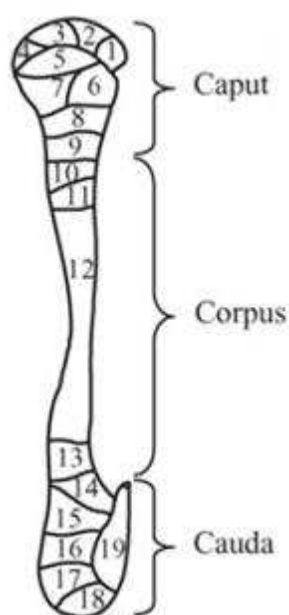


Figura 6 – Figura dos segmentos do epidídimo de rato. A região da CE distal de rato utilizada nos experimentos descritos nesta tese corresponde à região indicada por 19 (Modificada de Jelinsky *et al.* (2007)).

4.3.2 Validação da epididimite *in vivo*

Como parte do procedimento de validação do modelo de epididimite *in vivo*, realizamos RT-qPCR para avaliação da expressão relativa do transcrito *I11b*, marcador inflamatório (descrito na próxima subseção), e avaliação histológica. Para este último, epidídimos de animais C, Sal_6h e LPS25_6h foram coletados e fixados em solução de Bouin (formaldeído a 25%, solução saturada a 70% de ácido pícrico e ácido acético glacial a 5%) por 24 h e o excesso de ácido pícrico foi lavado em seguidas soluções de álcool etílico. Em seguida, as

peças foram embebidas em cera de parafina e seccionadas à 5 µm (cortes longitudinais). Os cortes utilizados para avaliação histológica foram corados com hematoxilina e eosina (HE), examinadas e fotografadas por microscopia de luz.

4.3.3 Ensaios de transcriptase reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Amostras congeladas de CE distais de epidídimos de ratos tratados com salina (Sal_6h) ou com LPS (LPS25_6h) foram pulverizadas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído com Trizol® (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. A transcrição reversa do RNA total (2,5 µg) foi realizada utilizando o *Thermoscript® RT-PCR System* (Invitrogen). O qPCR com as amostras de cDNA sintetizadas foi realizada utilizando o kit Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, #M303L) no sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 Real-Time PCR System® (ThermoFisher Scientific). As reações foram realizadas em duplicatas e amostras sem cDNA foram usadas como controle negativo. As amplificações foram realizadas utilizando *primers* específicos para cada alvo (Tabela 2) sob as seguintes condições de ciclo: 95 °C (1 min) e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60 °C (1 min). No final da reação, a curva de *melt* foi gerada a fim de confirmar a especificidade da amplificação.

Para cada alvo (*Adra1a*, *Adra1b*, *Adra1d*, *Adrbk1*, *Il1b* e *Ppia*), os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%). O ciclo de threshold (Ct) para replicata foi determinado usando o software QuantStudio® Design & Analysis v1.4.3. A eficiência de amplificação foi determinada para cada par de primers a partir de valores de Ct gerados por amostras de cDNA diluídas em série (Tabela 2). A expressão relativa de cada gene alvo foi normalizada com o gene de referência ciclofilina A (*Ppia*), utilizada como controle endógeno, e levou em consideração a eficiência de amplificação determinada experimentalmente (Pfaffl *et al.*, 2001). Os dados foram expressos como valores relativos ao grupo Sal_6h.

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados em estudos de qPCR, e seus respectivos números de acesso, sequência de pares de oligonucleotídeos, tamanho dos amplicons (em pares de bases, pb) e eficiência de amplificação

Transcrito	Nº de acesso	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)	Eficiência (%)
<i>Il1b</i>	NM_031512	CCAGGATGAGGACCCAAGCA TCCCGACCATTGCTGTTTCC	510	96
<i>Adra1a</i>	NM_017191	GCCTCAAGACGGACAAGTCA TCCGGGAAGAAAGACCCAATG	238	90
<i>Adra1b</i>	NM_016991	CTCAGCAGTACCAAGGCCAA GAGAACAGGGAGCCAAGCG	170	98
<i>Adra1d</i>	NM_024483	TACCCATGGCAGTGATCGTG AACAGAGAGCCCAGAGGCA	328	92
<i>Adrbk1</i>	NM_012776	AGGATCGAGGAGAAGTGACCT TTGGCCTCTTCCAGATGGTTC	97	103
<i>Ppia</i>	NM_017101	AGCACTGGGGAGAAAGGATT GATGCCAGGACCTGTATGCT	174	90

4.3.4 Experimentos de ligação do radioligante [³H]-Prazosin em segmentos da cauda do epidídimo

Os experimentos com radioligante em segmentos de tecido intacto foram realizados conforme previamente descrito (Muramatsu *et al.*, 2005). Os ductos epididimários isolados da porção distal da cauda do epidídimo de rato foram cortados em segmentos de 3-5 mm, e cada segmento foi incubado com [³H]-Prazosin por 16 a 18h a 4 °C em 250 µL de solução tampão Krebs com a seguinte composição (mM): NaCl 135,7, KCl 5,9, MgCl₂ 1,0, CaCl₂ 2,0, NaH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 10,5, e glicose 11,5, pH 7,4.

Nos experimentos de saturação da ligação, foram utilizadas concentrações crescentes de [^3H]-Prazosin (20 – 2000 pM) e as curvas de competição com concentração de 400 pM de [^3H]-Prazosin. Após o período de incubação, os segmentos de tecidos foram rapidamente secos em papel de filtro, transferidos para tubos de plásticos contendo 1,5 mL de solução tampão de Krebs à 4 °C e gentilmente agitados por 1 min a 1200 rpm. Posteriormente, os segmentos de tecidos foram secos em papel de filtro e solubilizados em 500 μL de solução 0,3 M de NaOH a 37 °C. Durante o período de solubilização, os tubos foram frequentemente agitados. A medição da radioatividade foi realizada com alíquotas de 100 μL de cada amostra dissolvida com a adição de 4 mL de líquido de cintilação (Optiphase Hi Safe 3, Perkin Elmer), em um contador de cintilação líquida.

A abundância de α_1 -ARs foi representada pela ligação máxima obtida pelo total de proteína mensurada no tecido (fmol por mg total de proteína no tecido). A quantidade de proteína total de cada segmento de tecido foi mensurada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976; Ernst *et al.*, 2010).

Curva de saturação

Segmentos de 3-5 mm da CE de rato foram incubados com 6 concentrações crescentes de [^3H]-Prazosin (20 – 2000 pM) na ausência (ligação total) ou na presença (ligação não-específica) de fentolamina 100 μM . A ligação específica foi deduzida pela subtração da "ligação total" – "ligação não-específica". Os dados foram submetidos a uma regressão não-linear no GraphPad Prism 5.01. A partir da curva de ligação específica, foi determinada a densidade de receptores (B_{max}) e afinidade (K_D) da ligação específica do [^3H]-Prazosin (atividade específica = 85,3 Ci/mmol).

Curvas de competição

Para determinação dos subtipos de α_1 -ARs expressos na CE distal de rato, foram realizados experimentos de inibição da ligação específica. Segmentos de 3-5 mm da CE foram equilibrados com concentrações crescentes de prazosin, RS 100329 ou BMY 7378 por 1h a 4 °C. Após este período de incubação, foi adicionado [^{3} H]-Prazosin $\cong$ 350 pM (K_D) em cada tubo por 14 – 16 h. A ligação específica também foi deduzida do valor obtido na presença fentolamina 100 μ M. A ligação específica do [^{3} H]-Prazosin atingida na presença das diferentes concentrações dos antagonistas foi expressa como porcentagem da ligação específica do [^{3} H]-Prazosin ($\cong$ 350 pM) na ausência de droga competidora. Em seguida, a estimativa da constante de dissociação em equilíbrio da droga competidora (pK_i) foi determinada de acordo com a equação de Cheng-Prusoff por análise de regressão não-linear no GraphPad Prism 5.01.

4.3.5 Experimento funcional farmacológico

Curvas concentração-resposta (CCR)

Após a dissecação da CE distal, as extremidades do órgão foram amarradas, e montadas na câmara muscular a 30 °C, fixando-se uma extremidade na haste de sustentação e a outra, por meio de uma linha de algodão, ligada ao transdutor isométrico com 1 g de tensão. Foi utilizada solução Tyrode modificada por Picarelli *et al.* (1962) com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5,7; CaCl₂, 1,8; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 15; e glicose 5,5 em água destilada borbulhada continuamente com uma mistura carbogênica (95% O₂, 5% CO₂). Os experimentos foram realizados após 30 min da montagem do órgão, que é o tempo necessário para a estabilização da preparação.

Foram realizadas CCRs para a determinação de parâmetros farmacológicos (descritos a seguir). É importante que a noradrenalina seja utilizada como agonista, pois outras

substâncias (p. ex., fenilefrina, metoxamina) apresentam diferentes eficácias nos diferentes subtipos de α_1 -ARs recombinantes (Minneman *et al.*, 1994).

O método utilizado nas construções das CCRs foi o descrito por Van Rossum (1963), que consiste em adicionar na câmara muscular quantidades cumulativas do agonista, utilizando a sequência 1+2+7+20+70+...etc., de maneira que a concentração do agonista aumente na razão 1,3,10,30,100,...etc. Inicialmente, foi adicionada ao banho uma concentração que não produz um efeito mensurável e a seguir foi adicionada uma quantidade da droga que somada a anterior resulte o valor seguinte da série. As adições foram repetidas até que seja atingida uma concentração que não mais produza aumento do efeito. Após atingido o efeito máximo, a preparação foi lavada e depois de, pelo menos 30 minutos, a CCR seguinte foi realizada.

Procurando satisfazer algumas condições consideradas “ideais” (Black *et al.*, 1972; Kenakin, 1982), todas as CCRs à noradrenalina na CE distal foram realizadas na presença de desipramina (100 nM), corticosterona (10 μ M), propranolol (100 nM) e ioimbina (100 nM) para bloquear a captação neuronal, a captação extraneuronal, adrenoceptores- β e adrenoceptores- α_2 , respectivamente.

Curvas concentração-resposta (CCRs) a agonistas na presença de antagonistas competitivos de α_1 -ARs

Estes experimentos foram realizados para a determinação da potência dos antagonistas (ver a descrição de pA_2 a seguir) para a posterior identificação dos subtipos de α_1 -ARs envolvidos nas ações da noradrenalina na CE distal com epididimite.

Nos experimentos de contração, os antagonistas foram incubados por 45 min, ao fim dos quais foi repetida a CCR à noradrenalina na presença do antagonista. Sempre que possível, foram utilizadas por experimento pelo menos três concentrações de antagonista, proporcionando a construção de gráficos de Schild com pelo menos três pontos. Além do

agonista noradrenalina, agonistas como bupirone (α_{1D} -seletivo) e oximetazolina (α_{1A} -seletivo) foram utilizados.

Como antagonistas seletivos de subtipos de α_1 -ARs, foram selecionados o RS 100329 (α_{1A} -seletivo) e o BMY 7378 (α_{1D} -seletivo), em razão de suas seletividades. Como antagonista não seletivo, foi utilizado o prazosin.

4.4 Parâmetros farmacológicos avaliados

Potência do agonista (pEC_{50})

O parâmetro pEC_{50} por definição, representa o valor negativo do logaritmo da concentração molar do agonista que produz 50% do efeito máximo. Ele reflete a potência do agonista em promover certo efeito farmacológico, ao mesmo tempo, a sensibilidade do órgão ao agonista. A pEC_{50} foi calculada pela regressão não-linear seguindo o modelo logístico de 3 parâmetros no GraphPad Prism 5.01. O valor negativo do logaritmo desta concentração representa a pEC_{50} em cada experiência, sendo, a seguir, determinados a média e o erro padrão de todos os experimentos.

Resposta máxima (E_{max})

Nos experimentos de contração, a tensão máxima desenvolvida (em g) pelos agonistas foi tomada como 100% para as CCRs seguintes realizadas na presença de antagonistas foram utilizadas como % das CCRs seguintes.

Potência do antagonista (pA_2)

Os valores de pA_2 foram determinados através da análise de regressão linear a partir dos dados locados em gráfico proposto por Arunlakshana *et al.* (1959) com a utilização da equação:

$$-\log K_B = \log [B] - \log (CR-1) \quad , \text{ onde:}$$

- CR é a relação de concentrações do agonista encontrada para a obtenção de efeitos iguais na ausência e na presença do antagonista;
- [B] é a concentração molar do antagonista;
- K_B é a constante de afinidade do antagonista pelo receptor em estudo.

A concentração do antagonista que promove um deslocamento à direita na CCR do agonista em 2 vezes (i.e. $CR = 2$) corresponde ao pA_2 . Em um gráfico cartesiano, quando os valores de $\log (CR - 1)$ são locados na ordenada e o $-\log [B]$ na abscissa, os pontos devem estar distribuídos ao longo de uma reta cuja inclinação deverá ser 1, caso o antagonismo seja do tipo competitivo clássico. O prolongamento da reta, na intersecção com o eixo da abscissa, fornece o valor do pA_2 que por sua vez corresponde ao valor do pK_B (Arunlakshana and Schild, 1959). O parâmetro CR reflete uma diferença entre dois valores de pEC_{50} obtidos antes e após um determinado tratamento. Valores negativos de CR expressam deslocamentos à esquerda nas curvas concentração-resposta e valores positivos mostram deslocamentos à direita. O CR foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$CR = pEC_{50} \text{ antes do tratamento} - pEC_{50} \text{ após tratamento}$$

Em situações nas quais a inclinação da regressão linear no gráfico de Schild tenha diferido de 1 ou o antagonismo tenha sido do tipo insuperável (intransponível), o pA_2 foi estimado a partir do CR da menor concentração efetiva do antagonista com a seguinte fórmula: $pA_2 = \log (CR-1) - \log [B]$, onde [B] é a concentração do antagonista e CR a “concentration ratio” como descrito anteriormente.

B_{max} , K_D e pK_I

O $B_{\max}$ corresponde à ligação máxima do radioligante, e representa o número de sítio de ligação, ou seja, a densidade de receptores.

K_D é a constante de dissociação de equilíbrio do complexo radioligante-receptor, e é uma representação da afinidade.

pK_i é logaritmo negativo do K_i , a constante de dissociação de equilíbrio de um complexo competidor-receptor medido em um estudo bioquímico. Basicamente, é o K_B para um antagonista, mas medido especificamente em um estudo de ligação bioquímica.

4.5 Exposição da CE distal ao LPS *in vitro*

Segmentos da CE distal de ratos foram incubados com LPS 300 ng/mL (ou com solução salina estéril - controle) durante 4 h, na ausência ou presença de 100 μ M de pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) um inibidor de NF κ B, que foi pré-incubado por 1 h. Foram decididas a concentração e o período de incubação do PDTC de acordo com estudos anteriores (Zhang *et al.*, 2010; Cianchetti *et al.*, 2018). Durante todo o período, os tecidos foram mantidos em solução nutritiva (descrita anteriormente) constantemente aerada. Em seguida, os segmentos da CE foram usados em experimentos funcionais farmacológicos, como descrito no item 4.3.5.

4.6 Drogas e reagentes

As drogas utilizadas foram as seguintes (fornecedor): Ioimbina: Yohimbine hydrochloride; Desipramine hydrochloride e RS 100329 (Tocris, U.K); Corticosterona: Corticosterone; Buspirona: buspirone Noradrenalina: (l)-Norepinephrine hydrochloride; Prazosin: Prazosin Hydrochloride; Propranolol: (dl)-Propranolol hydrochloride; BMY 7378; PDTC (Sigma-Aldrich, E.U.A); [^{3} H]-Prazosin ([7-Methoxy- ^{3} H]-prazosin), atividade específica =

85,3 Ci/mmol, #NET-823, PerkinElmer, E.U.A.); LPS de *E. coli* TRLpure (Innaxon, U.K.); CaCl_2 (Merck do Brasil); KCl (Merck do Brasil); MgSO_4 (Merck do Brasil); NaCl (Merck do Brasil); NaH_2PO_4 (Merck do Brasil); NaHCO_3 (Merck do Brasil).

4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm) de pelo menos 4 experimentos independentes para cada grupo. As diferenças estatísticas entre duas médias foram analisadas pelo teste *t* de Student, enquanto entre três ou mais médias foram analisadas através de análise de variância (ANOVA) e quando detectadas diferenças, a análise estatística será seguida do teste de Bonferroni. Foram consideradas significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O software utilizado para tratamento dos dados foi o GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Validação do modelo de epididimite *in vivo* induzida pela injeção intraductal de LPS de *E. coli*

A análise histológica do epidídimo evidenciou sinais clássicos de inflamação aguda na cauda do epidídimo de ratos submetidos à injeção intraductal de LPS, incluindo infiltração de neutrófilos e edema intersticial (Figura 7A). Em contraste, o epidídimo dos animais tratados com salina apresentou padrão histológico de acordo com a normalidade (Figura 7A). Visando confirmar o processo inflamatório agudo no epidídimo após o desafio intraductal com LPS, quantificamos por RT-qPCR os níveis relativos do transcrito da citocina pró-inflamatória *Il1b* (interleucina-1B). Após 6 h da injeção intraductal de LPS, os níveis relativos do transcrito *Il1b* aumentaram cerca de 30 vezes em comparação com o grupo controle (Figura 7B). Esses resultados confirmaram a indução da epididimite utilizando o modelo experimental proposto, estando de acordo com a literatura (Silva *et al.* (2018).

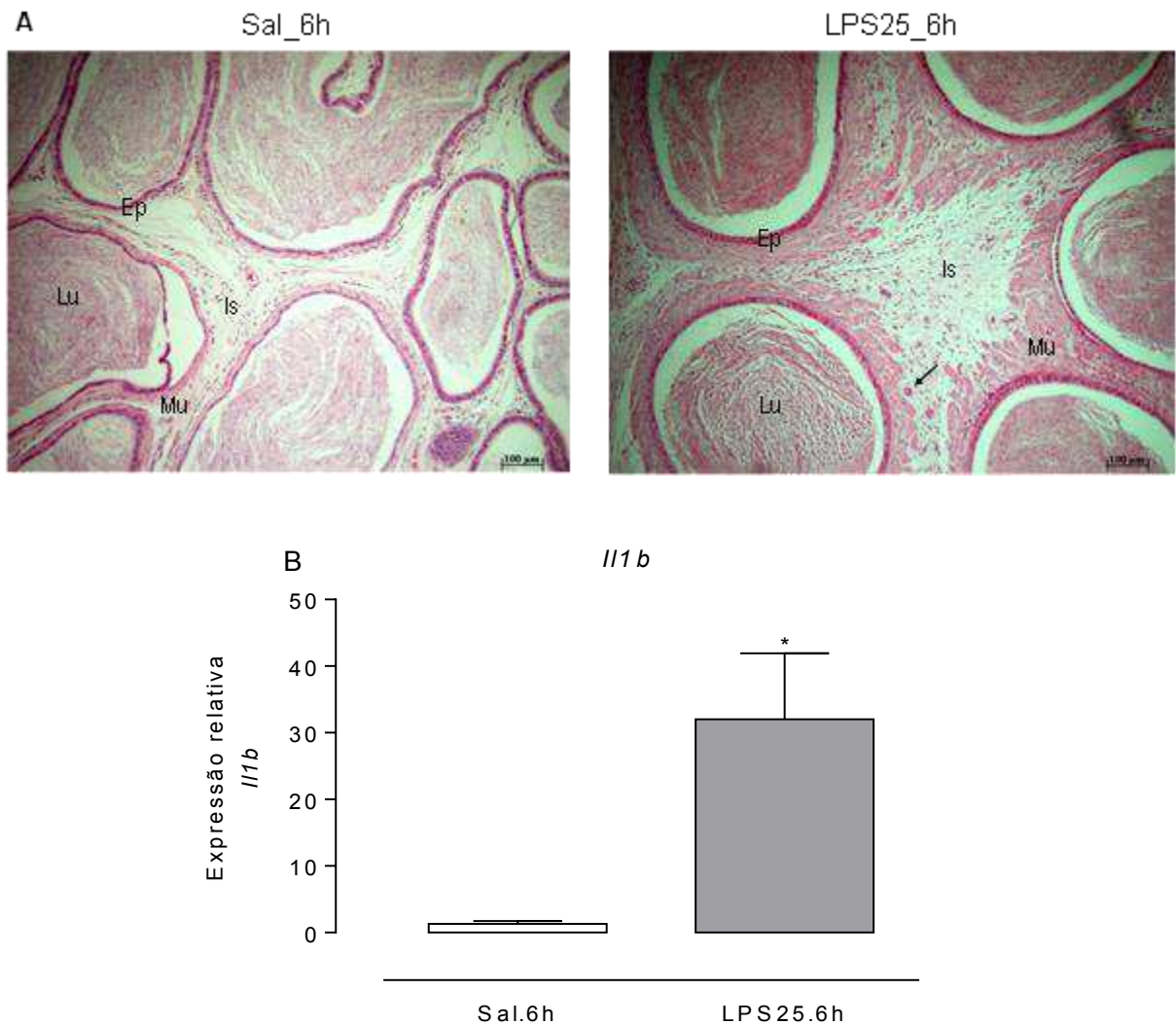


Figura 7 – Efeito da injeção intraductal de 25 µg de LPS na morfologia da cauda do epidídimo (CE) distal (A) e na expressão relativa do marcador pró-inflamatório *Il1b* (B). Fotos representativas da CE distal de ratos Sal_6h (à esquerda) e LPS25_6h (à direita). Sal_6h mostrou uma morfologia normal, enquanto que o LPS25_6h mostrou infiltração de neutrófilos (seta) e sinais de edema intersticial. Ep: epitélio, Is: espaço intersticial, Mu: cama de músculo liso, Lu: lúmen. Cortes de epidídimo foram corados com hematoxilina/eosina e as fotos tiradas em aumento de 10x. Resultados são representativos de experimentos realizados com 3 animais. Escala = 100 µm. Valores em (B) expressos como média ± epm, n= 7 e 9 ratos / grupo / em duplicada. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo Sal_6h (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

5.2 Avaliação do subtipo de α_1 -ARs funcional na contração à noradrenalina exógena em CE distal de rato com epididimite *in vivo*

A Figura 8A mostra curvas concentração-resposta (CCRs) para a noradrenalina na CE distal de ratos que foram tratados com LPS ou não. As CCRs para a noradrenalina determinadas nas CE distais de ratos LPS25_6h apresentaram-se deslocadas à esquerda daquelas determinadas na CE distal do grupo que recebeu salina (Sal_6h). Os valores médios da pEC_{50} para a noradrenalina em LPS25_6h e Sal_6h (barra horizontal), bem como cada valor individual são apresentados no gráfico de dispersão (Figura 8B), mostrando que a epididimite induzida por LPS aumentou a potência da noradrenalina em cerca de 6 vezes ($pEC_{50} \text{ LPS}_{6h} = 7,44 \pm 0,13$ vs $pEC_{50} \text{ Sal}_{6h} = 6,62 \pm 0,09$). Interessantemente, essa alteração da sensibilidade à noradrenalina não foi observada em CE distal após 24 h do tratamento com a endotoxina. A potência para a noradrenalina no grupo LPS25_24h foi semelhante aos grupos controle, Sal_6h e Sal_24h (Figura 8A-B). No entanto, a potência para a noradrenalina no grupo LPS25_24h foi cerca de 5 vezes menor em comparação ao LPS_6h ($pEC_{50} \text{ LPS}_{6h} = 7,44 \pm 0,13$ vs $pEC_{50} \text{ LPS}_{24h} = 6,72 \pm 0,16$) (Figura 8B). Isso indica que a alteração da potência da noradrenalina coincidiu com a vigência do evento inflamatório agudo, e essa contração do músculo liso mediada pelos α_1 -ARS na CE distal, especialmente durante essa fase aguda da epididimite induzida por LPS, foi investigada na presente tese.

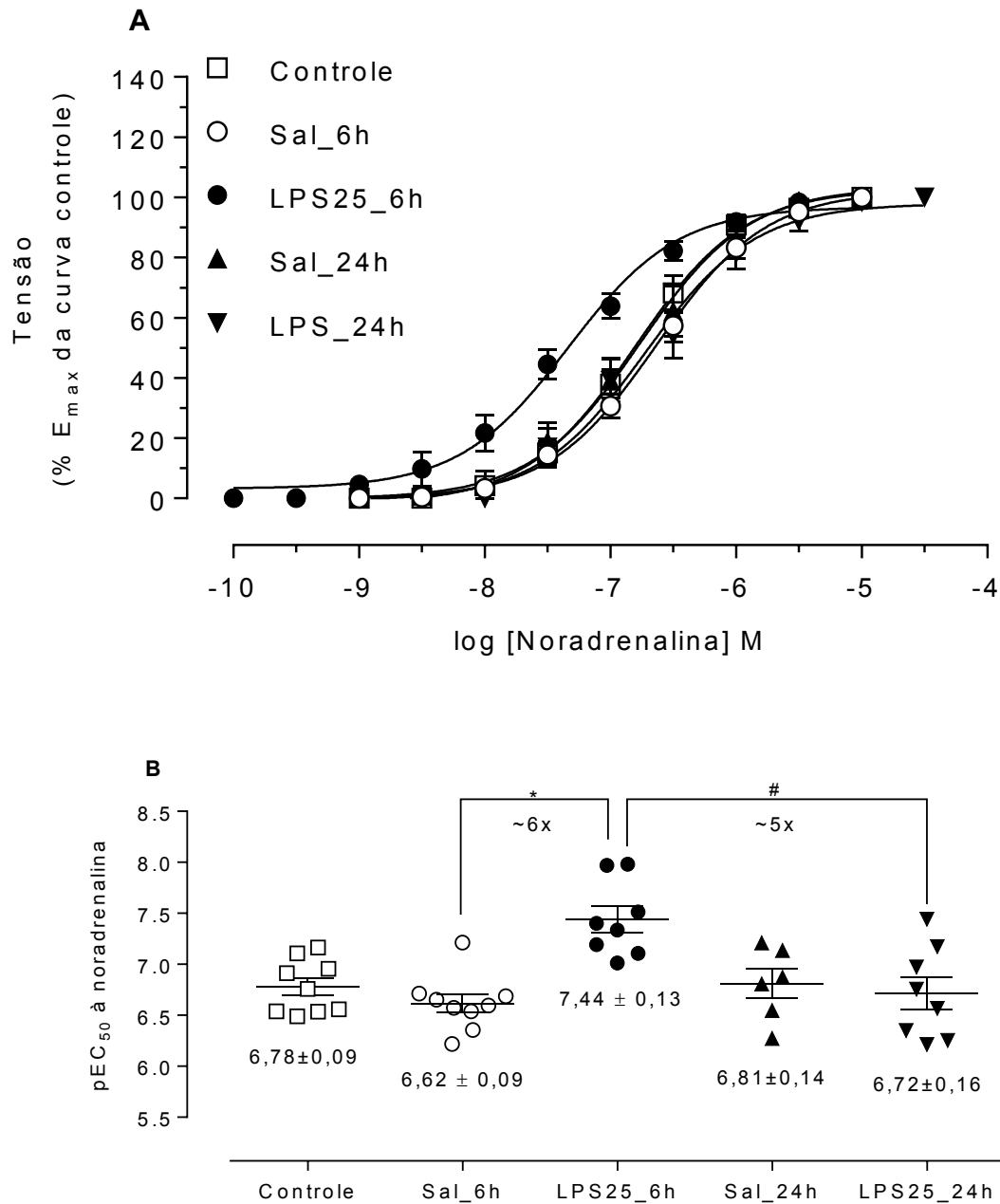


Figura 8 – Curvas concentração-resposta (CCRs) à noradrenalina em ductos da CE distal dos grupos Sal_6h e LPS25_6h (A). Os valores de pEC₅₀ extraídos das CCRs à noradrenalina comparados em gráfico de dispersão (B), representando o efeito da epididimite induzida por LPS na potência da noradrenalina após 6 h da injeção intraductal. Cada símbolo representa a média ± epm de 5-9 experimentos diferentes. * e # indicam diferenças estatisticamente significantes em comparação aos grupos Sal_6h e LPS25_6h, respectivamente (ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

A Figura 9 mostra CCRs para a noradrenalina determinadas na ausência e presença de concentrações crescentes de prazosin, um antagonista que apresenta afinidades semelhantes pelos três subtipos de α_1 -ARs, mas afinidade cerca de 1000 vezes menor por α_2 -ARs (Doxey *et al.*, 1984; Bylund *et al.*, 1992) ([guidetopharmacology/prazosin](http://guidetopharmacology.org/prazosin)). O prazosin (de 3 – 100 nM) antagonizou competitivamente as contrações induzidas pela noradrenalina (Figura 9) na CE distal, de maneira semelhante nos grupos controle (Figura 9A), Sal_6h (Figura 9B) e LPS25_6h (Figura 9C). A partir desse antagonismo, as regressões lineares no gráfico de Schild (Figura 9D) produziram valores de pA_2 similares ($\cong 9,0$, ver Tabela 3), com inclinações não diferentes da unidade teórica. A afinidade encontrada para o prazosin foi consistente com a participação de α_1 -ARs, indicando que mesmo no epidídimo inflamado, os α_1 -ARs estão envolvidos nas contrações induzidas pela noradrenalina.

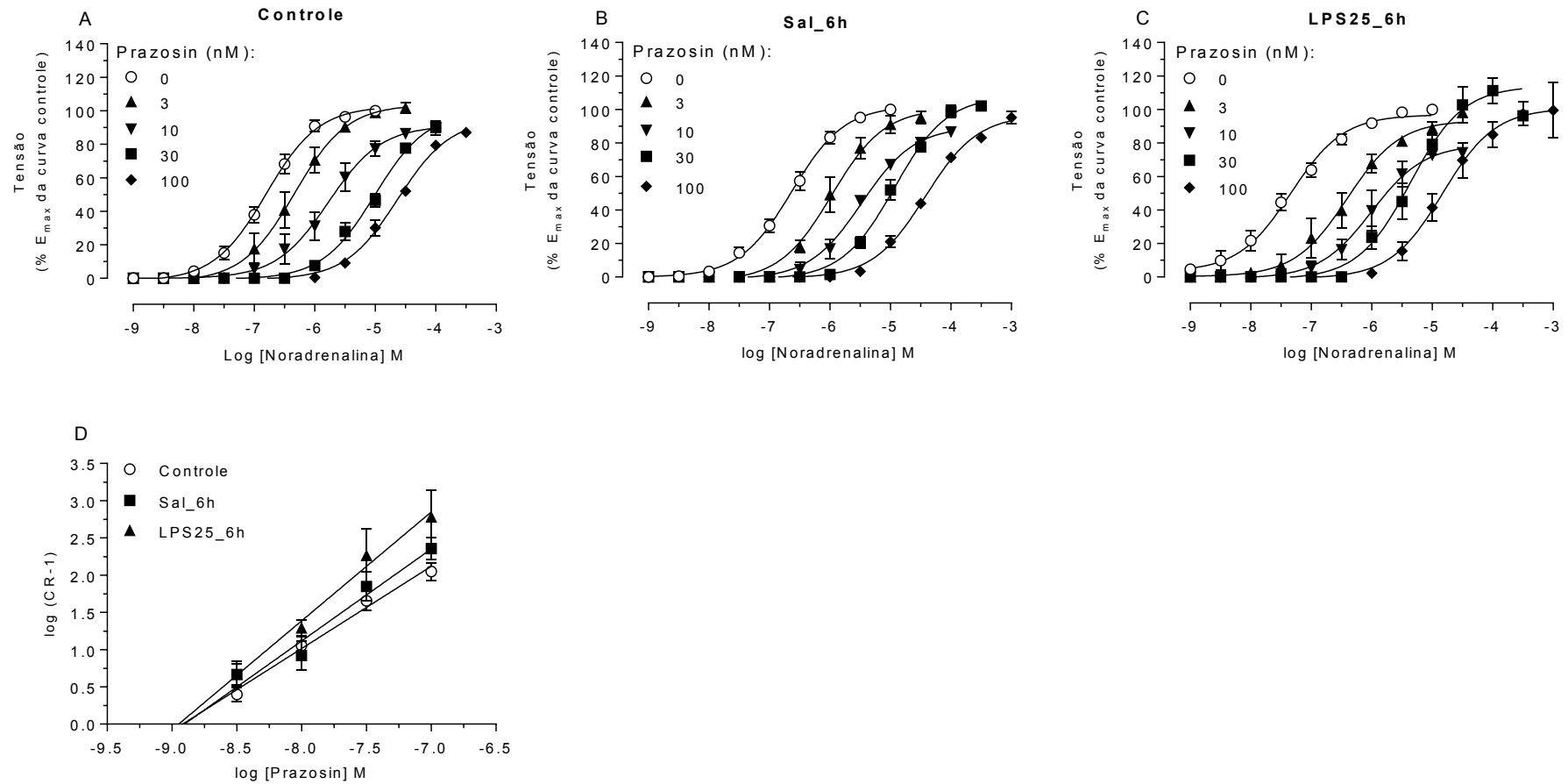


Figura 9 – Curvas concentração-resposta (CCRs) à noradrenalina na ausência e presença de concentrações crescentes de prazosin (3 – 100 nM) em ductos da CE distal dos grupos de grupos Controle (A), Sal_6h (B), LPS25_6h (C). As regressões de Schild para este antagonismo são apresentadas em D. Cada símbolo representa a média $\pm$ epm de 4-9 experimentos diferentes.

Concentrações crescentes de RS 100329 (de 1 – 30 nM), um antagonista α_{1A} -seletivo ([guidetopharmacology/rs-100329](http://www.guidetopharmacology.org/rs-100329), disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org>>), produziu deslocamento à direita nas CCRs à noradrenalina (Figura 10). Um antagonismo insuperável foi observado nas concentrações de 10 e 30 nM, que reduziram a E_{max} à noradrenalina nos grupos controle (Figura 10A), Sal_6h (Figura 10B) e LPS25_6h (Figura 10C).

No gráfico de Schild (Figura 10D) as inclinações não foram diferentes da unidade teórica em todos os grupos. Apesar disso, a potência estimada para o RS 100329, a partir do primeiro “log (CR-1)” positivo, em CE distal de ratos tratados com LPS foi estatisticamente menor (~2 vezes) daquela de ratos tratados com salina (pA_2 Sal_6h = $9,12 \pm 0,22$ vs pA_2 LPS25_6h = $8,76 \pm 0,09$, $p < 0,05$) (Figura 10E; Tabela 3), sugerindo uma diminuição da participação dos α_{1A} -ARs na contração da CE distal e o envolvimento de outro(s) subtipos(s) na contração induzida pela noradrenalina. Já as potências do antagonista na CE distal de ratos controle e salina foram semelhantes (pA_2 Controle = $9,35 \pm 0,05$ vs pA_2 Sal_6h = $9,12 \pm 0,22$, $p < 0,05$) (Figura 10E; Tabela 3), indicando que valores de pA_2 obtidos para o RS 100329 na CE distal dos grupos Controle e Sal_6h são consistentes com a ativação de α_{1A} -ARs nas contrações induzidas pela noradrenalina (Tabela 3) e que o resultado observado no LPS25_6h não foi decorrente do procedimento cirúrgico de indução da epididimite.

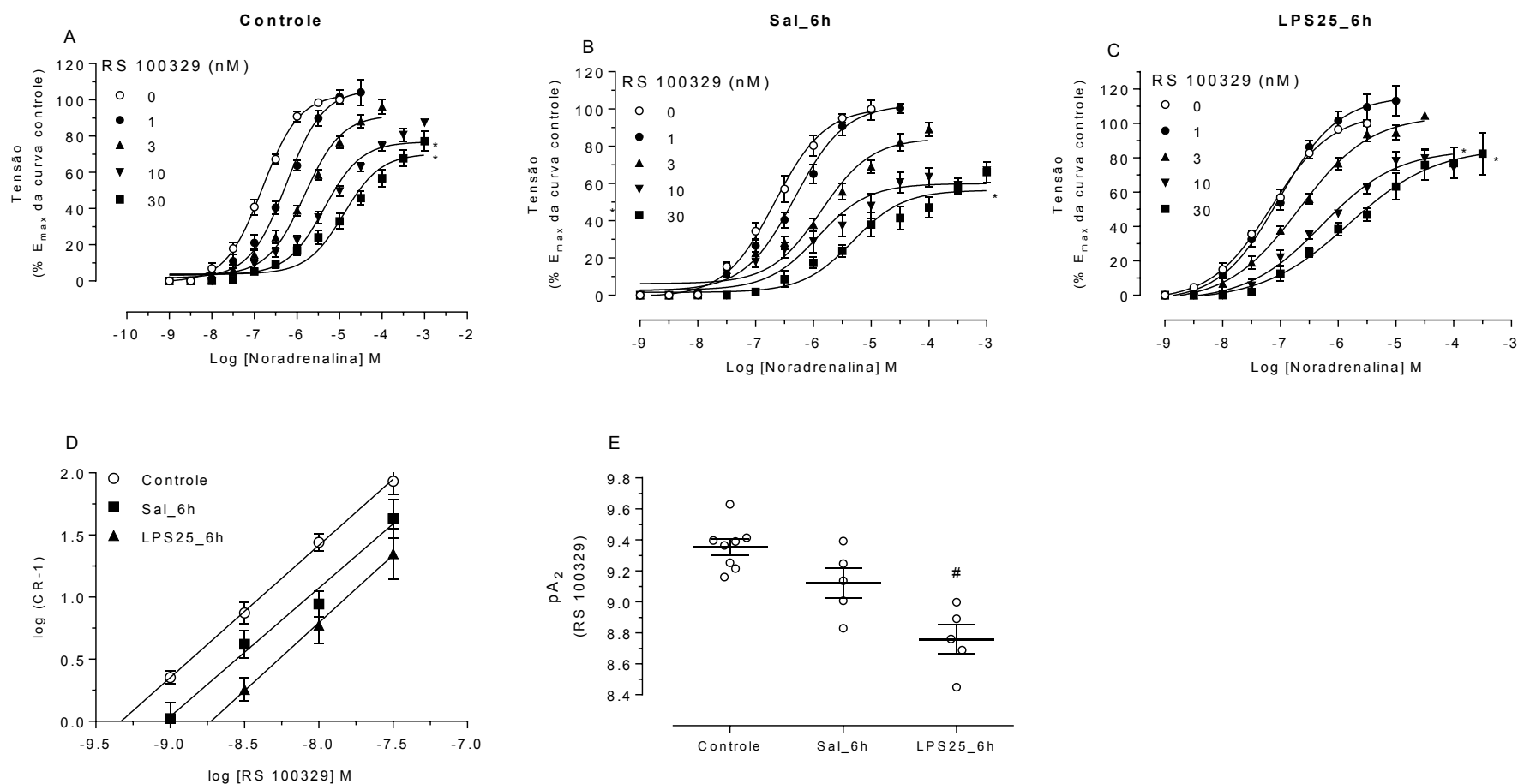


Figura 10 – Curvas concentração-resposta (CCRs) à noradrenalina na ausência de presença de concentrações crescentes de RS 100329 (1 – 30 nM) em ductos da CE distal dos grupos Controle (A), Sal_{6h} (B), LPS25_{6h} (C). As regressões de Schild para este antagonismo são apresentadas em D, e os valores de pA₂ no gráfico de dispersão em E. Cada símbolo representa a média ± epm de 5-8 experimentos diferentes. * significa E_{max} estatisticamente diferente (p<0,05, ANOVA, pós-teste de Bonferroni). # Estatisticamente diferente do grupo Sal_{6h} (p<0,05, ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

A Figura 11 mostra o efeito do antagonista α_{1D} -seletivo BMY 7378 ([guidetopharmacology/bmy-7378](http://www.guidetopharmacology.org/bmy-7378), disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org>>) nas contrações induzidas pela noradrenalina. Nos grupos controle (Figura 11A) e Sal_6h (Figura 11B), as CCRs à noradrenalina foram competitivamente antagonizadas pelo BMY 7378, gerando regressões no gráfico de Schild (Figura 11D) não diferentes de 1,0, e produzindo valores de pA_2 semelhantes ($\cong 7,0$, ver Tabela 3), consistentes com a participação de α_{1A} -ARs nas contrações mediadas pela noradrenalina na CE distal desses grupos experimentais, uma vez que valores de pA_2 maiores são esperados caso haja participação de α_{1D} -ARs.

Por outro lado, na CE distal de ratos tratados com LPS, baixas concentrações de BMY 7378 (3 – 300 nM) promoveram deslocamento à direita nas CCRs à noradrenalina (Figura 11C). No gráfico de Schild (Figura 11D), a inclinação da reta na regressão para este antagonismo foi menor que a unidade teórica (Tabela 3), indicando o envolvimento de uma população heterogênea de α_1 -ARs mediando as contrações da noradrenalina. Mais ainda, a alta potência estimada para o BMY 7378 ($pA_2 \cong 8,7$, ver Tabela 3) foi consistente com o envolvimento de α_{1D} -ARs nas contrações mediadas pela noradrenalina na CE distal inflamada.

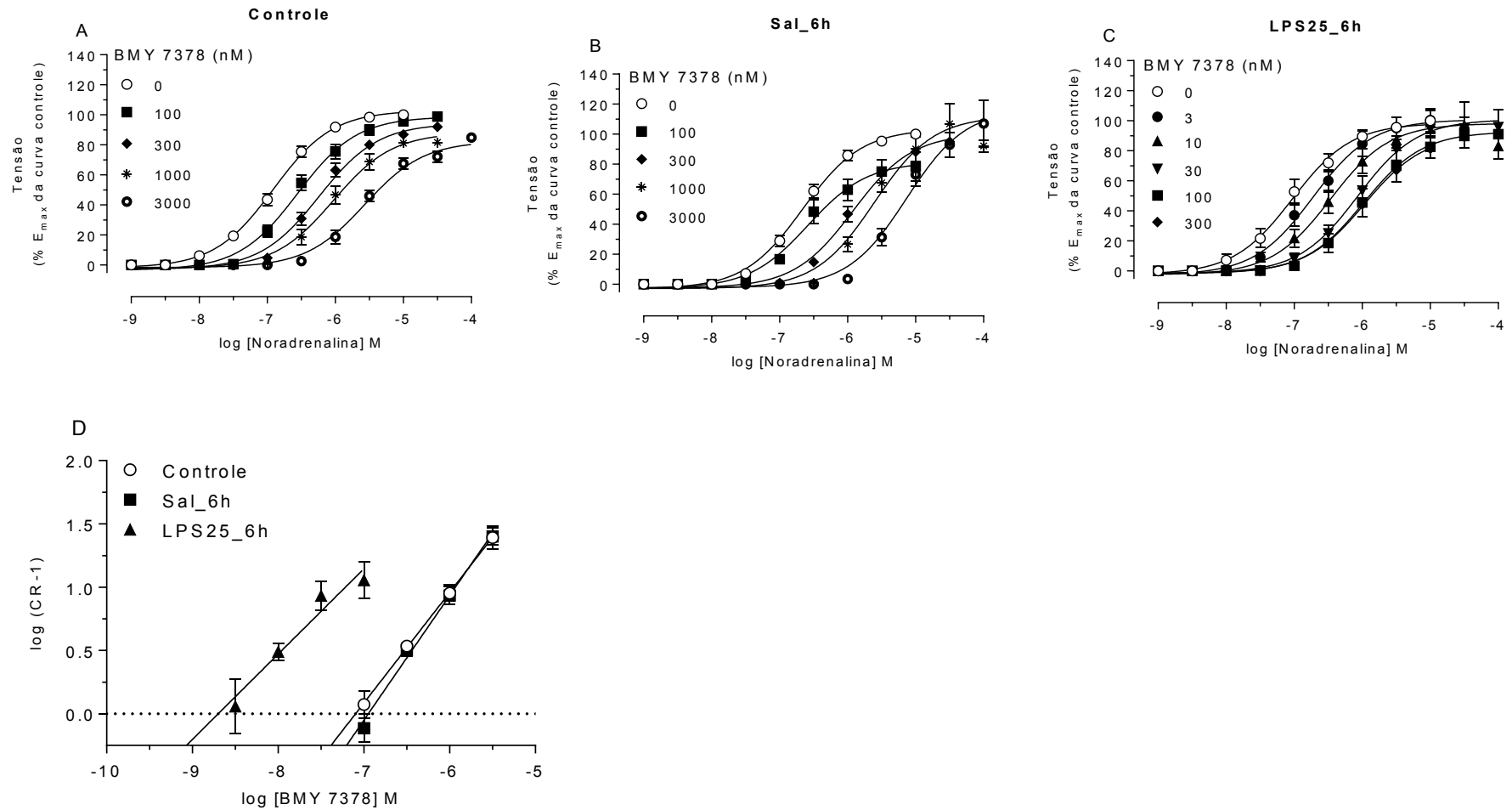


Figura 11 – Curvas concentração-resposta (CCRs) à noradrenalina na ausência de presença de concentrações crescentes de BMY 7378 (3 – 3000 nM) em ductos da CE distal dos grupos Controle (A), Sal_6h (B), LPS25_6h (C). As regressões de Schild para este antagonismo são apresentadas em D. Cada símbolo representa a média $\pm$ epm de 5-8 experimentos diferentes.

Tabela 3 – Estimativas de potência (pA₂) ou afinidade (pK_B) dos antagonistas seletivos contra as contrações induzidas pela noradrenalina na CE distal de rato.

As estimativas de afinidade e inclinação foram derivadas do gráfico de Schild

				pK _i #				pA ₂ / pK _B #			
		pK _B / pA ₂	Inclinação	α1A	α1B	α1D	Ref	α1A	α1B	α1D	Ref
Prazosin				9,53	9,97	9,77	a,b,c	9,01	9,38	9,61	a,c
Grupo	Controle	8,92 ± 0,06	1,10 ± 0,10 (0,88 – 1,33)								
	Sal_6h	8,90 ± 0,10	1,23 ± 0,17 (0,86 – 1,60)								
	LPS25_6h	8,94 ± 0,14	1,46 ± 0,23 (0,97 – 1,95)								
RS 100329				9,60	7,50	7,90	a	9,60	7,80	7,90	a
Grupo	Controle	9,33 ± 0,04	1,06 ± 0,07 (0,92 – 1,21)								
	Sal_6h	9,04 ± 0,05	1,03 ± 0,11 (0,80 – 1,26)								
	LPS25_6h	8,73 ± 0,08*	1,09 ± 0,21 (0,64 – 1,54)								
BMY 7378				7,04	6,92	8,59	c	7,03	6,53	8,50	c
Grupo	Controle	7,09 ± 0,05	0,87 ± 0,07 (0,73 – 1,01)								
	Sal_6h	6,95 ± 0,03	0,98 ± 0,07 (0,85 – 1,12)								
	LPS25_6h	8,70 ± 0,07	0,67 ± 0,12 (0,42 – 0,93)								

Dados representam a média ± epm (pK_B e pA₂) ou média e intervalo com 95% de confiança de 4-9 experimentos diferentes. * significa diferença estatisticamente significativa vs grupo Sal_6h (p <0,05, teste *t* de Student). #Valores médios de pK_i ou pA₂ / pK_B retirados da literatura: ^aWilliams et al. (1999); ^bBremner et al. (2000); ^cNojimoto et al. (2010).

5.2.1 Avaliação da participação dos α_{1D} -ARs na contração da CE distal inflamada pela bupirone

Para melhor investigar esse envolvimento do α_{1D} -ARs nas contrações da CE distal com epididimite, foram realizadas CCRs à bupirone, a qual ativa seletivamente α_{1D} -ARs (Eltze *et al.*, 1999), na ausência e presença de BMY 7378 30 nM (Figura 12). Na CE distal tratada com LPS, a bupirone foi 3 vezes mais potente em relação ao tratado com salina (Figura 12A, 12D; Tabela 4). Além disso, o BMY 7378 30 nM deslocou cerca de 15 vezes a CCR à bupirone na CE distal de epidídimo inflamado (Figura 12C; Tabela 4), produzindo um pA_2 estimado de $8,67 \pm 0,15$. Este valor é consistente com a ativação de α_{1D} -ARs e fornece suporte experimental ao envolvimento dos α_{1D} -ARs na contração do músculo liso da CE distal inflamada. Na CE distal tratada com salina, o antagonista BMY 7378 não foi capaz de deslocar a CCR à bupirone (Figura 12B; Tabela 4).

Tabela 4 – Valores da potência (pEC_{50}) à bupirone na ausência e presença de BMY 7378 em animais Sal_6h e com epididimite

[BMY 7378], nM	pEC_{50} à bupirone (média $\pm$ epm)	
	Sal_6h	LPS25_6h
0	$4,36 \pm 0,15$	$4,93 \pm 0,15^{\#}$
30	$4,13 \pm 0,14$	$3,72 \pm 0,14^*$

$\#$ significa estatisticamente diferente de Sal_6h na ausência de BMY 7378. $*$ significa estatisticamente diferente de LPS25_6h na ausência de BMY 7378. ANOVA, pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

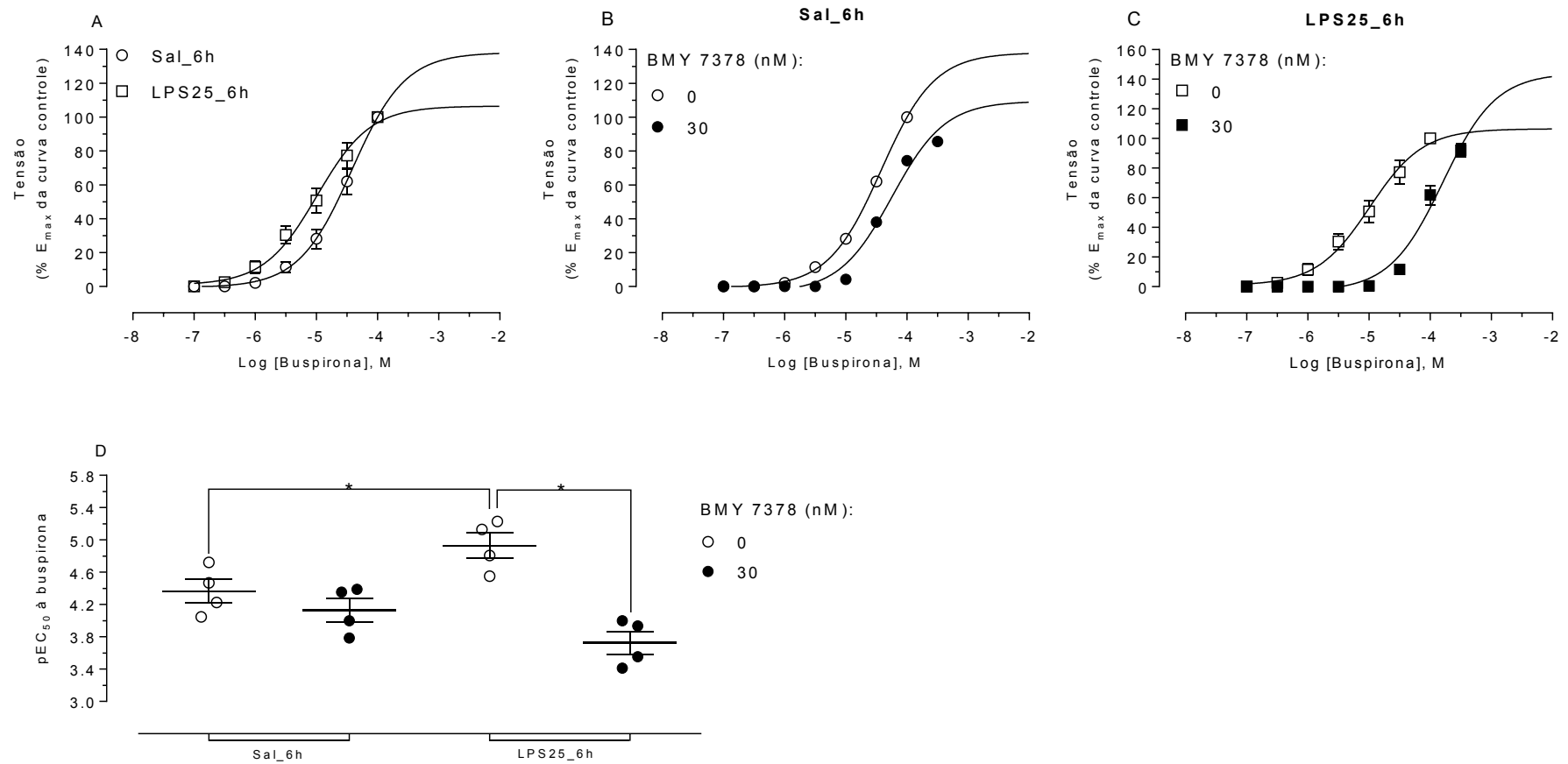


Figura 12 – Curvas concentração-resposta (CCRs) à buspirona na ausência (A) e presença de BM Y 7378 30 nM em ducto de CE distal grupos Sal_6h (B) e LPS25_6h (C). Os valores de pEC₅₀ são comparados no gráfico de dispersão (D). Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, o epm de 4 diferentes experimentos. Os valores de pEC₅₀ e E_{max} para buspirona foram baseados no ajuste de E_{max} pela regressão não-linear do GraphPad Prism 5.01. * Significa estatisticamente diferente da pEC₅₀ obtida para a buspirona na ausência de BM Y 7378 no grupo LPS25_6h ($p < 0,05$, teste t de Student).

5.3 Avaliação da contração mediada por α_1 -ARs após a exposição *in vitro* de segmento da CE distal ao LPS

Uma vez identificada a co-participação dos α_{1D} -ARs na contração do músculo liso da CE distal inflamada, perguntou-se: poderia a ativação do NF κ B, como parte da sinalização do TLR4, ter algum papel nessa alteração α_{1A}/α_{1D} -ARs? Para buscar responder a essa pergunta, utilizou-se um modelo de inflamação induzido por exposição ao LPS *in vitro*.

Na Figura 13, é apresentado o efeito da exposição *in vitro* ao LPS em CE distal sobre CCRs para a noradrenalina. Em segmentos expostos ao LPS, as CCRs à noradrenalina foram deslocadas à direita pelo BMY 7378 30 nM (Figura 13A), produzindo um $pA_2 = 8,44 \pm 0,06$, consistente com participação de α_{1D} -ARs. Como o resultado observado foi semelhante ao tratamento com LPS *in vivo*, possivelmente a participação α_{1D} -ARs induzida por LPS é independente de fatores sistêmicos. Em ductos expostos à solução salina (Figura 13B), o antagonista BMY 7378 não deslocou as CCRs à noradrenalina.

A fim de investigar o envolvimento da via inflamatória dependente de NF κ B nesse processo, o PDTC 100 μ M, um inibidor desse fator de transcrição, foi utilizado no ensaio. Interessantemente, em tecidos que foram incubados com PDTC previamente ao desafio com LPS (Figura 13C), o BMY 7378 não foi capaz de deslocar as CCRs à noradrenalina, indicando que PDTC impediu a co-participação de α_{1D} -ARs em CE distal exposta ao LPS, e que o fator NF κ B pode estar envolvido neste processo. Em tecidos que foram incubados com PDTC previamente à solução salina, o BMY 7378 também não deslocou as CCRs à noradrenalina (Figura 13D).

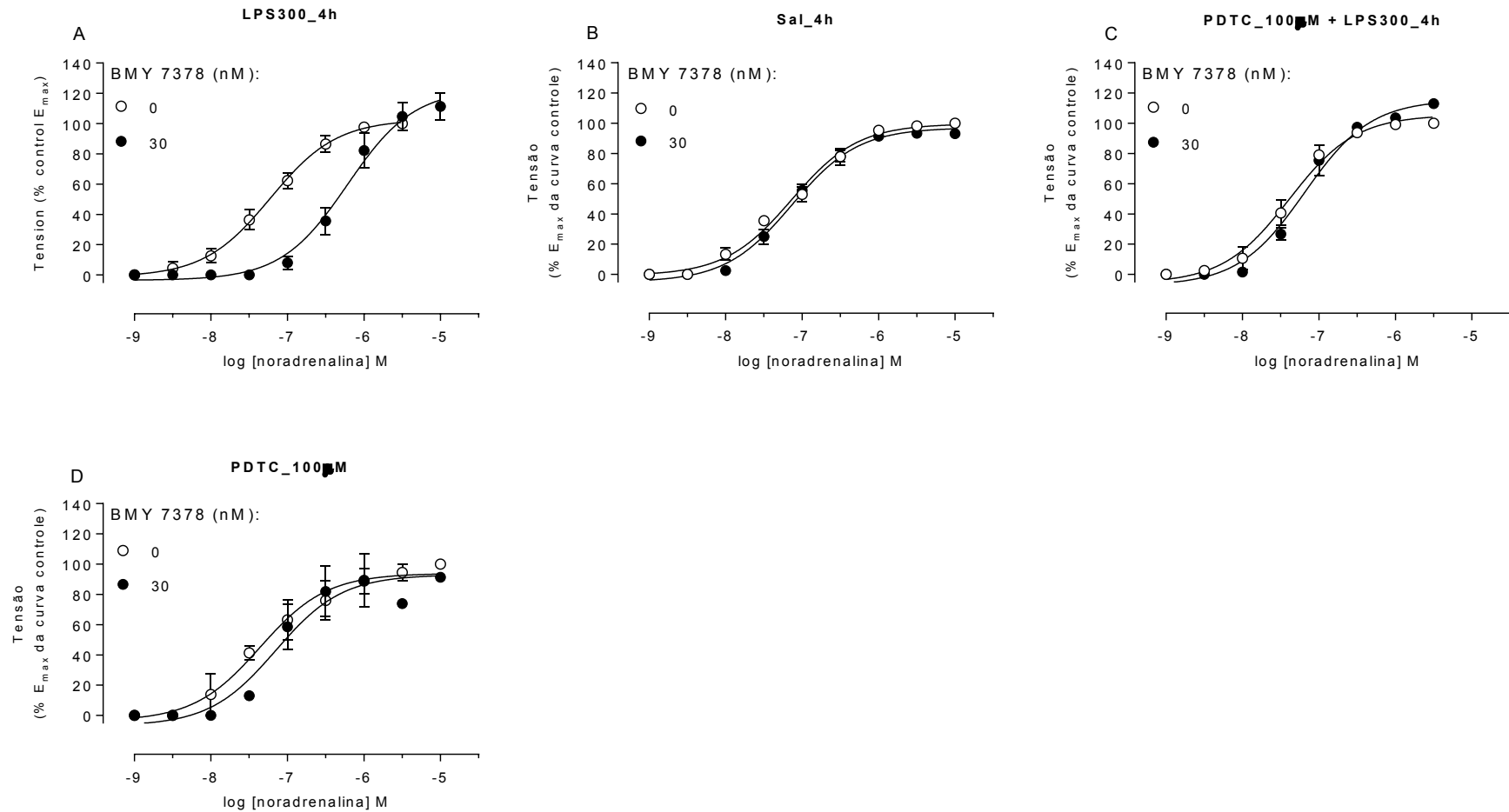


Figura 13 – Efeito da exposição *in vitro* ao LPS, pré-incubado ou não com PDTC, em curvas concentração-resposta (CCRs) à noradrenalina na ausência e presença de BM Y 7378 30 nM em ducto da CE distal dos grupos experimentais LPS300_4h (A), Sal_4h (B), PDTC.100 μ M+LPS300_4h (C) e PDTC.100 μ M (D). Cada símbolo representa a média $\pm$ epm de 3 diferentes experimentos.

Adicionalmente, neste modelo de epididimite *in vitro* analisamos a ação da oximetazolina (Figura 14A), um agonista seletivo de α_{1A} -ARs (Minneman *et al.*, 1994). No segmento exposto ao LPS, a oximetazolina apresentou uma potência ~6 vezes menor (Figura 14B) em relação ao segmento exposto à salina ($pEC_{50} \text{ Sal}_{4h} = 7,00 \pm 0,12$ vs $pEC_{50} \text{ LPS}_{300_4h} = 6,22 \pm 0,25$, $p < 0,05$, teste *t* de Student), indicando diminuição da participação contrátil dos α_{1A} -ARs na contração.

Considerando que os resultados funcionais apontaram para essa heterogeneidade funcional α_{1A}/α_{1D} -ARs na CE distal inflamada, perguntou-se: poderia essa alteração funcional α_{1A}/α_{1D} -ARs na CE distal inflamada ser consequência de mudanças na expressão dos subtipos do receptor em níveis de transcrito e/ou proteína? Para responder a esse questionamento, foram realizados ensaios de binding e RT-PCR em tempo real.

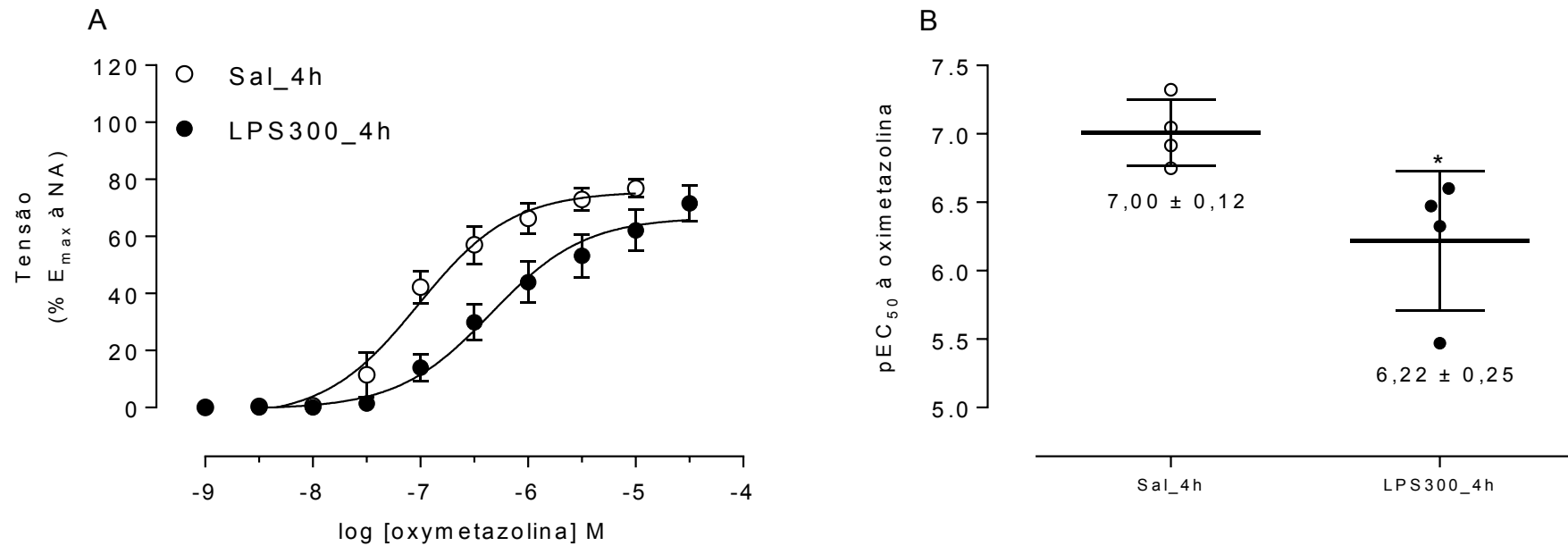


Figura 14 – Curvas concentração-resposta (CCRs) para a oximetazolina em ducto de CE distal grupos Sal_4h (○) e LPS300_4h (●) (A). Os valores de pEC₅₀ extraídos das CCRs são comparados em gráfico de dispersão (B), representando o efeito da exposição in vitro ao LPS sobre a potência da oximetazolina. Nas CCRs, a E_{max} para a oximetazolina foi normalizada para a E_{max} para a noradrenalina. Cada símbolo representa a média ± epm de 4 experimentos diferentes. * indica diferença estatisticamente significativa em comparação aos grupos Sal_4h (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

5.4 Avaliação da expressão relativa de transcritos de α_1 -ARs na CE distal de rato com epididimite *in vivo*

Utilizando PCR em tempo real, avaliamos a expressão relativa dos transcritos para os α_{1A} -ARs (Figura 15A), α_{1B} -ARs (Figura 15B), α_{1D} -ARs (Figura 15C) e para GRK2 (Figura 15D). A epididimite induzida por LPS não alterou a expressão relativa desses transcritos na CE distal 6 h após o estímulo (Figura 15).

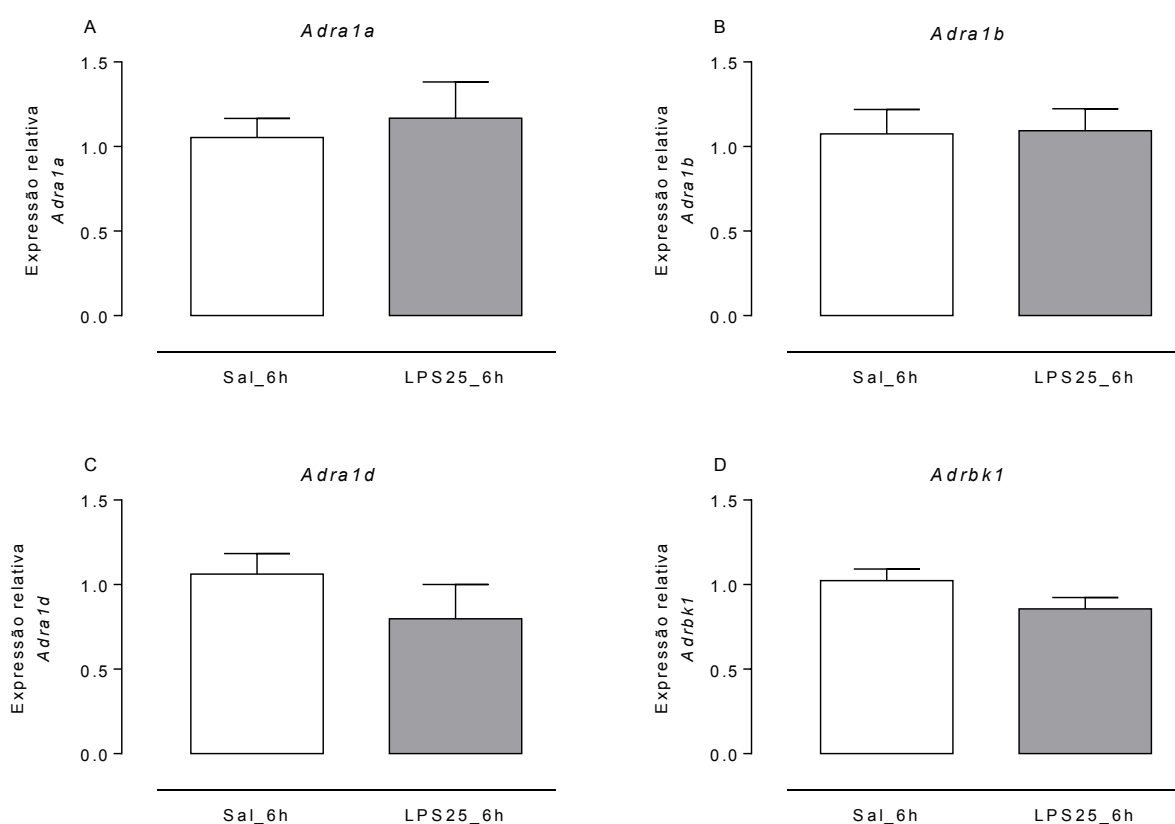


Figura 15 – Expressão relativa dos adrenoceptores- α_{1A} , *Adra1a* (A), α_{1B} , *Adra1b* (B) e α_{1D} , *Adra1d* (C) em CE distal de ratos Sal_6h e LPS25_6h. Os dados foram normalizados para seu controle interno (*Ppia*) e expressos como valores relativos de seu grupo de controle de solução salina (Sal_6h). Os resultados são expressos como média $\pm$ epm de 7-9 diferentes experimentos realizados em duplicata.

5.5 Avaliação da expressão de α_1 -ARs na CE distal por experimento de binding

A expressão dos α_1 -ARs na CE distal com epididimite foi investigada por experimentos de binding utilizando o [^{3} H]-Prazosin em segmentos intactos da CE de rato. A ligação específica do [^{3} H]-Prazosin foi determinada em curvas de saturação (Figura 16), produzindo uma constante de dissociação em equilíbrio (K_D) de ~300, ~320 e ~380 pM nos grupos Controle, Sal_6h e LPS25_6h, respectivamente. Todos valores de K_D estimados para o [^{3} H]-Prazosin foram consistentes com a interação com α_1 -ARs (Tabela 5).

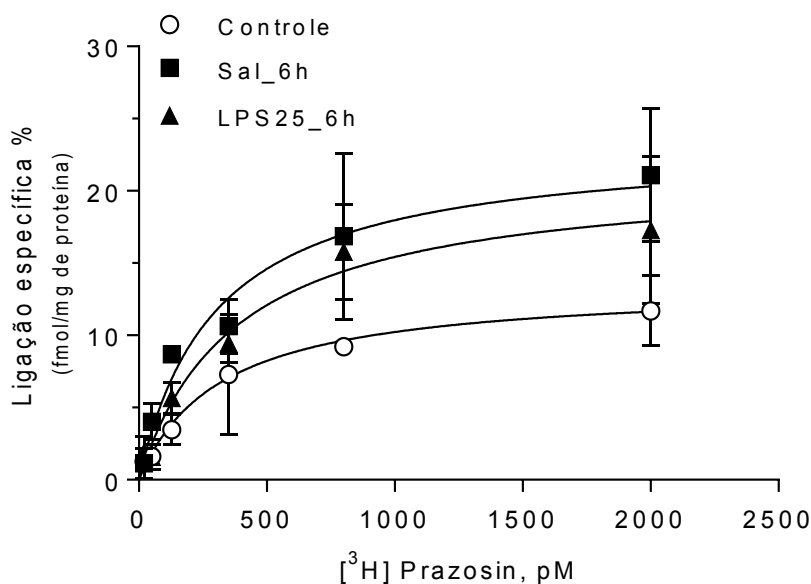


Figura 16 – Binding do [^{3} H]-Prazosin em segmentos intactos da CE distal de rato controle ou tratados com salina ou LPS. Curvas de saturação da ligação específica do [^{3} H]-Prazosin. Dados representam média $\pm$ epm de 3 – 5 animais por grupo.

Tabela 5 – Densidade de receptores (B_{max}) e afinidade (K_D) da ligação específica do [^{3} H]-Prazosin em segmentos da CE distal intactos de rato nos diferentes grupos experimentais

	Controle	Sal_6h	LPS25_6h
B_{max} (fmol/mg de proteína)	11,69 $\pm$ 2,41	21,08 $\pm$ 4,60	17,30 $\pm$ 5,07
K_D (pM)	320,1 $\pm$ 244,0	300,3 $\pm$ 124,3	382,0 $\pm$ 231,3

Dados representam média $\pm$ epm de 3 – 5 animais por grupo.

A ligação específica do [^{3} H]-Prazosin 350 pM foi completamente inibida pelos competidores prazosin, RS 100329 e BMY 7378 na CE distal tratada com salina e LPS. Os dados são apresentados de duas maneiras: na Figura 17, as curvas de inibição são apresentadas por grupo experimental, enquanto na Figura 18 são apresentadas para cada um dos competidores utilizados. As curvas de inibição da ligação específica do [^{3} H]-Prazosin pelo ligante prazosin foi melhor ajustada para uma competição com um único sítio, com uma estimativa de afinidade consistente com interação com α_1 -AR nos grupos controle, Sal_6h e LPS25_6h (Figuras 17 e 18A).

De modo complexo, o RS 100329 apresentou perfis diferentes entre os grupos experimentais. Nos grupos controle e salina, a curvas de inibição pelo RS 100329 foram monofásicas, enquanto que no grupo LPS a curva foi bifásica ($p < 0.05$, teste F), discriminando um sítio de alta afinidade ($pK_{I\ High} = 9,72$) e um de baixa afinidade ($pK_{I\ Low} = 8,13$) (Figuras 17 e 18B). O sítio de alta afinidade observado pelo RS 100329 no grupo LPS25_6h ($\cong 9,72$) é consistente com a interação com α_{1A} -ARs, enquanto que o de baixa afinidade ($\cong 8,13$) é compatível com interação com α_{1B} - ou α_{1D} -ARs.

Semelhantemente, a inibição da ligação específica pelo BMY 7378 foi melhor ajustada por uma curva bifásica ($p < 0.05$, teste F), discriminando um sítio de alta afinidade ($pK_{I\ High}$) e um sítio de baixa afinidade ($pK_{I\ Low}$) em todos os grupos experimentais (Figuras 17 e 18C; ver Tabela 6). Os valores de $pK_{I\ High}$ obtidos para o BMY 7378 ($\cong 8,70$) em todos os grupos experimentais estão de acordo com a interação de α_{1D} -ARs, enquanto os valores de $pK_{I\ Low}$

($\cong 6,80$) são consistentes com α_{1A} - ou α_{1B} -ARs. Entretanto, a alta afinidade encontrada para o RS 100329 indica que esse sítio de baixa afinidade seja possivelmente o α_{1A} -ARs (Tabela 6).

Na Tabela 6, são apresentadas as constantes de dissociação em equilíbrio dos competidores prazosin, RS 100329 e BMY 7378, obtidas das curvas de inibição da ligação específica do [^{3} H]-Prazosin em segmentos da CE distal de rato.

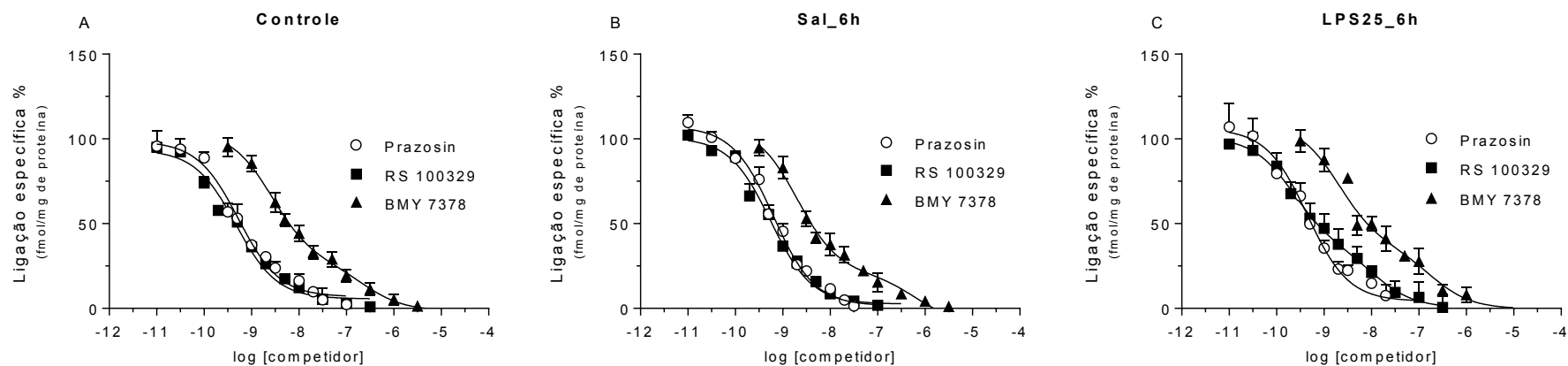


Figura 17 – Curvas de inibição da ligação específica ao $[^3\text{H}]$ -Prazosin 350 pM em segmentos intactos da CE distal de rato com os ligantes prazosin (seletivo para α_1), RS 100329 (seletivo para α_{1A}) e BMY 7378 (seletivo para α_{1D}) em animais controle (A), salina (B) e LPS (C). Dados representam média $\pm$ epm obtidos com segmentos da CE distal de 3-6 ratos diferentes.

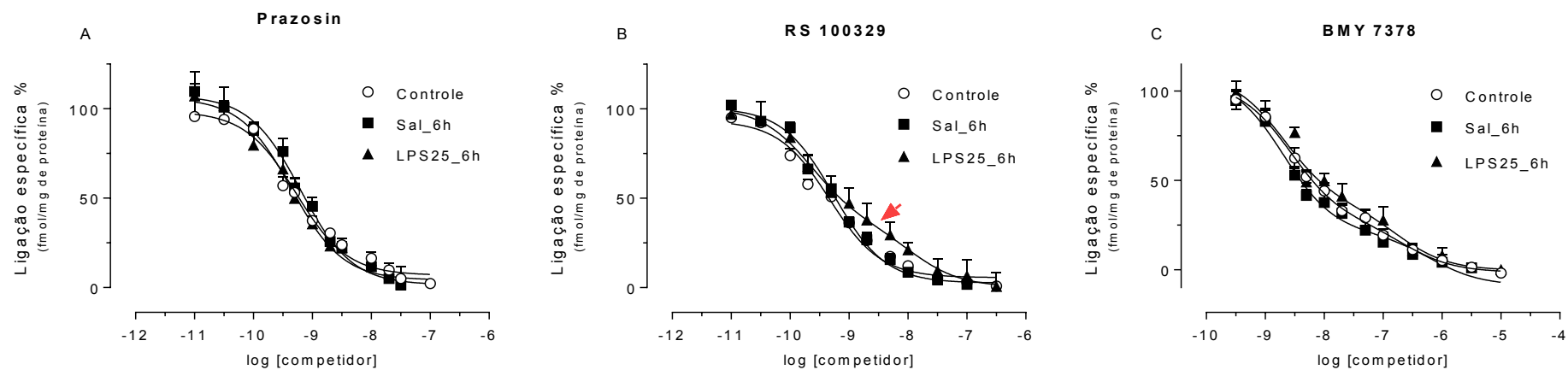


Figura 18 – Curvas de inibição da ligação específica ao [^{3} H]-Prazosin 350 pM em segmentos intactos da CE distal de rato de animais controle (○), Sal_6h (■) e LPS_6h (▲) com os ligantes prazosin (A), RS 100329 (B) e BMY 7378 (C). Dados representam média $\pm$ epm obtidos com segmentos da CE distal de 3-6 ratos diferentes. Seta (✓) representa o sítio de baixa afinidade ao RS 100329 identificado no grupo LPS25_6h.

Tabela 6 – Constantes de dissociação em equilíbrio (pK_i) do prazosin, RS 100329 e BMY 7378 derivadas das curvas de inibição da ligação específica do [^3H]-Prazosin em segmentos intactos da CE distal de rato tratado com LPS

	Controle		Sal_6h		LPS25_6h		$pK_i^{\#}$			Ref
	$pK_{i\ High}$	$pK_{i\ Low}$	$pK_{i\ High}$	$pK_{i\ Low}$	$pK_{i\ High}$	$pK_{i\ Low}$	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}	
Prazosin	9,58 $\pm$ 0,08	--	9,50 $\pm$ 0,05	--	9,65 $\pm$ 0,09	--	9,53	9,97	9,77	a,b,c
RS 100329	9,63 $\pm$ 0,05	--	9,56 $\pm$ 0,05	--	9,95 $\pm$ 0,33	8,23 $\pm$ 0,60	9,60	7,50	7,90	a
BMY 7378	8,87 $\pm$ 0,15	6,92 $\pm$ 0,35	8,99 $\pm$ 0,14	6,49 $\pm$ 0,37	8,99 $\pm$ 0,27	7,03 $\pm$ 0,38	7,04	6,92	8,59	c

Dados representam média $\pm$ epm de 3-6 diferentes ratos. $^{\#}$ Valores médios de pK_i retirados da literatura: ^{a} Williams *et al.* (1999); ^{b} Bremner *et al.* (2000); ^{c} Nojimoto *et al.* (2010).

6. DISCUSSÃO

A epididimite aguda, causada por ascensão retrógrada de bactéria pelo trato urogenital, é a causa mais comum de dor intraescrotal, de maneira que a condição e sintomas da epididimite resultam em impacto negativo no bem-estar do homem e na fertilidade masculina (Trojian *et al.*, 2009). O agente patogênico predominante dessa infecção epididimária é a *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa (Pilatz *et al.*, 2015). Análise ultrassonográfica de pacientes com epididimite aguda detectou que o inchaço foi predominantemente na cauda do epidídimo (CE) (Pilatz *et al.*, 2013), região onde tem sido sugerido que as respostas imunológicas e inflamatórias são mais intensas (Michel *et al.*, 2015). Pesquisas usando modelos experimentais de epididimite têm focado em aspectos morfológicos, imunológicos e inflamatórios, enquanto alterações funcionais contráteis têm sido apenas marginalmente consideradas. Considerando isso, e sabendo da importância da contração orquestrada pelo sistema simpático no epidídimo, utilizamos dois modelos experimentais de epididimite em ratos, um *in vivo* e outro *in vitro*, para estudar o efeito da resposta inflamatória aguda induzida por LPS ultrapuro de *E. coli* na contração mediada pelos α_1 -ARs na CE.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a contração mediada pelos α_1 -ARs no músculo liso da CE é mediada predominantemente pelo subtipo α_{1A} (Pacini *et al.*, 2018). Nossos experimentos de contração iniciais indicaram uma maior potência à noradrenalina em CE distal após 6 h de tratamento intraductal com LPS, mostrando uma maior sensibilidade ao agonista na CE distal com epididimite. Esse efeito rápido do LPS já foi observado em outros sistemas. Por exemplo, a endotoxemia induzida por LPS administrado por via intravenosa (iv) produziu deslocamento à esquerda nas CCRs à fenilefrina e aumento do E_{max} em artéria mesentérica superior de coelho 30 min após o tratamento (Liang *et al.*, 2014). Considerando que estudos anteriores relacionaram a hipersensibilidade da noradrenalina ou fenilefrina em situações envolvendo maior participação dos α_{1D} -ARs (Minneman *et al.*, 1994; Taki *et al.*, 2004) motivamo-nos a investigar a possível participação

desse receptor na contração induzida pela noradrenalina na CE distal com epididimite induzida por LPS.

O prazosin, um ligante com afinidades semelhantes entre os subtipos de α_1 -ARs, ou seja, que não faz distinção entre os subtipos de α_1 -ARs, antagonizou competitivamente as CCRs para a noradrenalina em todos os grupos, com uma afinidade consistente com α_1 -ARs, indicando que, mesmo na CE distal inflamada, as contrações à noradrenalina são mediadas por α_1 -ARs. O ligante BMY 7378, que apresenta uma seletividade de ~30 vezes para α_{1D} -ARs sobre os α_{1A} - e α_{1B} -ARs (Goetz *et al.*, 1995), antagonizou as contrações da CE distal inflamada com alta potência, identificando o envolvimento dos α_{1D} -ARs na contração do músculo liso deste tecido. Interessantemente, esse antagonismo ocorreu de maneira não-proporcional, produzindo uma regressão de Schild menor que a unidade teórica e apontando para uma população heterogênea de α_1 -ARs (Kenakin, 1982) mediando a contração à noradrenalina no músculo liso da CE distal inflamada. Estudo prévio demonstrou que os α_{1A} -ARs são o subtipo funcional na CE (Pacini *et al.*, 2018), apesar dos α_{1D} -ARs terem sido encontrados em nível de transcrito e/ou proteína na cauda do epidídimo de rato adulto (Queiroz *et al.*, 2002; Pacini *et al.*, 2018). Tomando isso em consideração, nossos resultados indicam que os α_{1D} -ARs, naturalmente quiescentes na função contrátil, passam a participar da contração do músculo liso da CE distal inflamada por injeção intraductal de LPS.

Conforme esperado, na CE distal de ratos não-tratados e Sal_6h, o RS 100329, um antagonista competitivo com seletividade α_{1A} de ~50 vezes em relação a α_{1D} (Williams *et al.*, 1999) apresentou potência consistente com a participação funcional de α_{1A} -ARs. Contrariamente, o RS 100329 indicou uma participação mitigada dos α_{1A} -ARs na resposta contrátil do músculo liso da CE distal inflamada, uma vez que a potência estimada para esse antagonista diminuiu quando comparada à obtida em CE distal controle. Dessa forma, é razoável considerar que o antagonismo do RS 100329 complementa a evidência suscitada pelo antagonismo do BMY 7378, sustentando a hipótese de uma população heterogênea α_{1A} -

/ α_{1D} -ARs mediando as contrações induzidas pela noradrenalina no músculo liso da CE distal com epididimite.

Apesar de inesperado para um antagonista competitivo clássico, para o qual deve ser observado diminuição de potência do agonista com preservação do E_{max} , o RS 100329 apresentou um antagonismo insuperável (intransponível). Isso pode ser resultado de uma situação de hemi-equilíbrio (Kenakin *et al.*, 2006), onde há uma lenta dissociação do antagonista do receptor e o curto período de tempo necessário para o registro da contração é insuficiente para a reocupação do receptor pela noradrenalina, produzindo como consequência a redução na resposta máxima.

Adicionalmente, os resultados com a oximetazolina, um derivado imidazólico com atividade agonista de moderada seletividade para α_{1A} -ARs (Minneman *et al.*, 1994), e com a buspirona, uma azaspirona que é agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A} e que demonstrou agonismo seletivo no α_{1D} -ARs (Eltze *et al.*, 1999), suportam o envolvimento dos α_{1D} -ARs nas contrações induzidas pela noradrenalina no músculo liso da CE distal com epididimite. Além da CE distal tratada com LPS ter sido mais sensível (~3 vezes) à buspirona, suas contrações foram potentemente antagonizadas pelo antagonista BMY 7378, possivelmente devido à maior participação funcional do subtipo de α_{1D} -ARs. De modo semelhante, Kamikihara *et al.* (2007) também observaram um aumento na potência da buspirona (~4 vezes), detectando um aumento do componente α_{1D} -ARs em artéria caudal de ratos reserpinizados. Na epididimite *in vitro*, um modelo que se correlacionou bem com a epididimite *in vivo*, a CE distal exposta ao LPS foi menos sensível à oximetazolina, indicando menor participação dos α_{1A} -ARs na contração do músculo liso deste tecido. Em conjunto, esses efeitos observados apontam para um aumento da participação de α_{1D} -ARs, em detrimento do envolvimento de α_{1A} -ARs na CE distal inflamada. Em seguida, perguntamos se essas alterações funcionais poderiam ser consequência de modificações da expressão em nível de transcrito e/ou de proteínas dos α_1 -ARs?

Em ensaios de RT-qPCR observamos aumento na expressão de *Il1b*, confirmando a epididimite *in vivo*, de acordo com o previamente relatado (Silva *et al.*, 2018). Em linha com esse dado, IL-1 β foi dosada pulmão, fígado e rim de ratos com endotoxemia sistêmica induzida por LPS (iv), e a maior concentração dessa citocina foi encontrada 6 h após a injeção do LPS, em comparação com 12 h e 24 h (Bucher *et al.*, 2003). A expressão relativa dos transcritos para os subtipos de α_1 -ARs (*Adra1a*, *Adra1b* e *Adra1d*) não foram alterados durante a epididimite, pelo menos considerando 6 h após o tratamento com LPS, diferentemente de alguns estudos anteriores que abordaram a expressão dos α_1 -ARs em condições de injúrias em outros sistemas. Por exemplo, a desnervação química com reserpina induziu um aumento do transcrito *Adra1d* em artéria caudal de rato (Taki *et al.*, 2004; Kamikihara *et al.*, 2007), enquanto a vasoplegia causada por choque séptico diminuiu os transcritos *Adra1d* na aorta de camundongo (Kandasamy *et al.*, 2015). Apesar de não detectarmos alterações na expressão de mRNA para os subtipos de α_1 -ARs, estudos futuros devem investigar se há ou não regulação na transcrição dos genes que codificam os α_1 -ARs em períodos de tempo diferentes daquele utilizado neste estudo (6 h). Isso porque diferentes expressões de α_1 -ARs foram encontradas de acordo com o tempo em artéria mesentérica superior de coelho, em um modelo de endotoxemia induzida por LPS (Liang *et al.*, 2014).

Além disso, Kandasamy *et al.* (2015) também observaram aumento na expressão de mRNA da GRK2 (*Adrbk1*), em anéis de aorta de camundongos sépticos, 7 dias após a indução da sepse por ligadura e punção do ceco. A proteína fosforiladora GRK2, conhecida pela sua relação com a dessensibilização e internalização de GPCR após a ativação do receptor pelo agonista (Ferguson, 2001), tem sido considerada um importante modulador de respostas inflamatórias, condição onde a expressão ou função dessa proteína está aumentada, sugerindo a GRK2 como potencial alvo para tratamento de algumas doenças (Han *et al.*, 2018). Nossos resultados indicaram que a epididimite induzida por LPS não modificou a expressão de GRK2, entretanto vale destacar que outros períodos, bem como a função desta proteína devem ser investigados em estudos futuros. Portanto, considerando os resultados

de RT-qPCR, optamos por investigar se potenciais mudanças nos níveis proteicos dos α_1 -ARs poderiam estar ocorrendo de maneira independente dos níveis de mRNA para esses alvos.

Curvas de saturação mostraram densidade de α_1 -ARs e afinidade ao [^{3} H]-Prazosin semelhantes entre os grupos experimentais. Curvas de competição em resposta ao radioligante [^{3} H]-Prazosin quando utilizado o ligante não-marcado prazosin foram monofásicas e produziram valores de pK_i consistentes com a interação com α_1 -ARs na CE distal de rato controle e tratado com salina e LPS. Curvas de competição para o BMY 7378 foram melhor ajustadas para curvas bifásicas; o sítio de alta afinidade indica uma interação desse ligante com α_{1D} -ARs e o de baixa afinidade com α_{1A} - ou α_{1B} - ARs, nos grupos controle, conforme já observado por Pacini *et al.* (2018), salina e LPS.

Na CE de ratos, estudos anteriores utilizaram como ligantes α_{1A} -seletivos não-marcados o 5-metil-urapidil (Queiróz *et al.*, 2002) e RS 100329 (Pacini *et al.*, 2018), revelaram que α_{1A} - e α_{1D} -ARs são expressos em densidade similares (Pacini *et al.*, 2018). No presente trabalho usamos o RS 100329, que identificou sítios de alta e baixa afinidade no grupo LPS, mas não nos grupos controle e salina. As afinidades calculadas das curvas monofásicas de sítio único para o RS 100329 nos grupos controle e salina foram consistentes com a interação com α_{1A} -ARs, indicando, também, que o sítio de baixa afinidade observado para o BMY 7378 nesses grupos é provavelmente o α_{1A} -ARs. Por outro lado, no grupo LPS a curva bifásica para o RS 100329 identificou uma população heterogênea de α_1 -ARs; o sítio de alta afinidade foi consistente com a interação com α_{1A} -ARs e o de baixa afinidade com α_{1B} - ou α_{1D} - ARs. De maneira similar, estudo prévio realizou curvas de inibição com o RS 100329 em ducto deferente de ratos submetidos à simpatectomia química pela 6-OH-dopamina, sendo que em umas das curvas foi identificado um perfil bifásico com dois sítios de ligação, apesar do total de experimentos ter melhor se ajustado ao modelo monofásico (Cleary *et al.*, 2004). Assim, essa discriminação de uma população heterogênea no grupo LPS, mas não nos grupos controle e salina, é possivelmente uma característica do tecido em questão, e não do RS

100329. Em artéria caudal de ratos após a desnervação química com reserpina, uma indução de α_{1D} -ARs foi identificada, pois a curva de competição para o BMY 7378 produziu um componente de alta afinidade quando comparada com a curva monofásica para ratos não desnervados; além disso, foi também detectada uma redução de α_{1A} -ARs devido à uma diminuição do sítio de alta afinidade do KMD-3213 (competidor α_{1A} -seletivo) em ratos tratados (Taki *et al.*, 2004). Portanto, as curvas de competição na CE distal com o BMY 7378 indicaram populações semelhantes de α_{1D} -ARs em todos os grupos experimentais, entretanto curvas com o RS 100329 com CE distal inflamada identificaram um sítio de alta afinidade (α_{1A} -ARs) e um de baixa afinidade (mais provavelmente α_{1D} -ARs).

A alta potência do BMY 7378 foi também observada no modelo de exposição de segmentos de CE distal ao LPS durante 4 h *in vitro*. Portanto, a co-participação de α_{1D} -ARs induzida por LPS foi comparável em ambos os modelos (*in vivo* x *in vitro*) e, além disso, indicou que a heterogeneidade funcional de α_1 -ARs induzida por LPS foi independente de resposta sistêmica, pelo menos no contexto de avaliação da contração. Assim, dispostos a elucidar se a ativação do NF κ B, como parte da sinalização do TLR4, está relacionada com essa plasticidade dos α_1 -ARs, o modelo *in vitro* foi explorado. De fato, a inibição do fator de transcrição NF κ B pelo PDTC impediu a co-participação dos α_{1D} -ARs na CE distal exposta ao LPS, uma vez que em segmentos pré-incubados com PDTC as contrações para a noradrenalina não foram antagonizadas pelo BMY 7378 em baixa concentração. Isso revelou que a co-participação de α_{1D} -ARs induzida por LPS na contração da CE distal depende do NF κ B e, provavelmente, de outros genes cuja transcrição depende deste fator de transcrição, como citocinas e outros mediadores inflamatórios. Entretanto, a seletividade desse inibidor farmacológico deve ser também questionada, uma vez que o PDTC pode ter diferentes alvos como proteólise dependente de proteassoma I κ B-ubiquitina ligase (Hayakawa *et al.*, 2003) e ERK (Chung *et al.*, 2000). Pelo menos ao nosso conhecimento, informações sobre sua seletividade ainda são ausentes. Assim, as concentrações escolhidas normalmente baseiam-se em estudos anteriores que reportam a efetividade do PDTC em inibir o NF κ B, já que a

janela de seletividade do ligante com outro(s) alvo(s) ainda é elusiva. Como suporte, estudos futuros com outros inibidores (QNZ, por exemplo) ou estratégias de silenciar o NF κ B são importantes. Outra abordagem que merece ser mencionada é remoção do epitélio da CE distal (utilizando Triton X-100, por exemplo) (Mewe *et al.*, 2007), a fim de elucidar uma possível dependência entre os eventos observados no músculo liso com mediadores oriundos do epitélio na circunstância inflamatória.

Sumarizando, em estudos de contração, agonistas e antagonistas seletivos identificaram um componente funcional de α_{1D} -ARs com envolvimento diminuído de α_{1A} -ARs na CE distal com epididimite induzida por LPS, porém sem alteração dos transcritos para os subtipos de α_1 -ARs e para GRK2, conforme demonstrados nos ensaios de RT-qPCR. Em paralelo ao achado em estudos funcionais, no contexto de análise da proteína, ensaios de binding indicaram um aumento da população do subtipo α_{1D} na CE distal inflamada. Interessantemente, nossos estudos de contração com segmento de CE distal incubada com LPS (epididimite *in vitro*) indicaram que a resposta de co-participação dos α_{1D} -ARs foi local e que parece ser dependente do NF κ B. Esses achados sugerem uma complexa regulação dos α_1 -ARs na CE distal em um contexto de perturbação inflamatória (Figura 19).

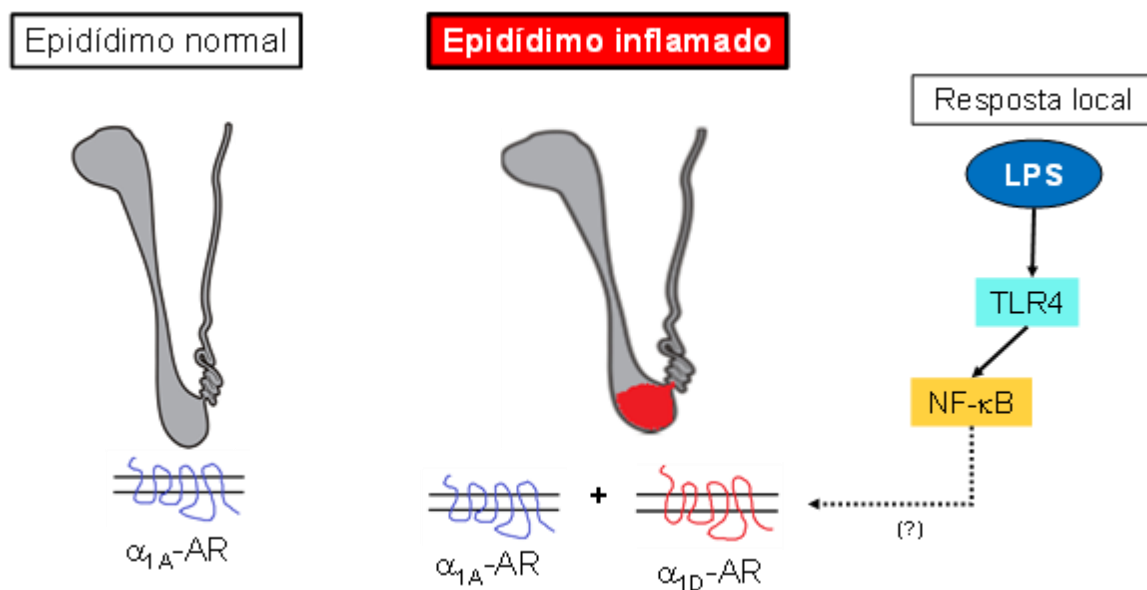


Figura 19 – Modelo de trabalho proposto demonstrando os efeitos fisiopatológicos da epididimite induzida por LPS sobre os α_1 -ARs. No epidídimo normal (esquerda), o subtipo α_{1A} é funcionalmente responsável pela contração do músculo liso da CE. Na CE distal após o tratamento com LPS (direita), uma população heterogênea de α_1 -ARs foi identificada, de modo que a co-participação α_{1D} -ARs foi NF- κ B-dependente.

Em circunstâncias inflamatórias e estressoras, há um aumento de noradrenalina e/ou adrenalina (Roupe van der Voort *et al.*, 2000; Kandasamy *et al.*, 2015), e o estímulo agonista pode ocasionar internalização de GPCRs. Alternativamente, é proposto que receptores em compartimentos intracelulares podem ser transferidos para a membrana, contribuindo para uma rápida *upregulation* em condições fisiológicas e fisiopatológicas (von Zastrow *et al.*, 1993; Hirasawa *et al.*, 1997). Em células HEK-293, a maior parcela de α_{1D} -AR é expressa em compartimentos intracelulares, embora exista alguma expressão do α_{1D} -AR na superfície celular (Chalothorn *et al.*, 2002; Hague *et al.*, 2004), diferentemente dos outros subtipos, atribuindo ao α_{1D} -AR uma característica atípica. Mais ainda, a internalização mediada por agonista foi detectada para os α_{1A} - e α_{1B} -ARs, mas não para os α_{1D} -ARs (Chalothorn *et al.*, 2002; Perez-Aso *et al.*, 2013). Além disso, houve diminuição da proteína α_{1A} -AR em artéria mesentérica superior de coelho após 4 h da infusão intravenosa de LPS; interessante, o antagonismo de IL-1 β com IL-1ra atenuou esse decréscimo dos α_{1A} -ARs induzido pela

endotoxemia, contribuindo para o entendimento da vasoplegia na sepse (Liang *et al.*, 2014). Em nossos estudos, na CE distal tratada com LPS observamos diminuição da participação funcional dos α_{1A} -ARs, mas não de sua expressão ou densidade. Isso pode ser decorrente de algum outro tipo de regulação do α_{1A} -AR, da escala de tempo investigada ou da limitação e/ou variabilidade da técnica (binding) que utilizamos para essa finalidade. Diferentemente dos nossos resultados, outros estudos demonstraram que citocinas pró-inflamatórias em resposta ao NFkB promoveram diminuição na expressão dos três subtipos de α_1 -ARs, e a inibição do fator de transcrição atenuou consideravelmente essa *downregulation* dos α_1 -ARs mensurada em vários órgãos, como rim, fígado, pulmão e coração (Bucher *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2009). Em contrapartida, ao considerar a perturbação de uma desnervação, o método de binding com segmento de tecido apontou uma indução de α_{1D} -ARs e uma redução de α_{1A} -ARs em artéria caudal de rato reserpinizada (Taki *et al.*, 2004).

Notavelmente, as expressões e populações de α_1 -ARs variam de acordo com as circunstâncias, métodos e tecidos e, não muito incomum, com resultados conflitantes. Entretanto, lançam possibilidades para compreensão da sinalização dos α_1 -ARs e do efeito da epididimite induzida por LPS sobre a contração do músculo liso da CE distal de rato. Dessa forma, propomos que nessa condição inflamatória da CE distal, a noradrenalina estaria aumentada e, somada à ação de citocinas cuja expressão é aumentada de forma dependente de NFkB, levaria a uma inativação / internalização de α_{1A} -ARs que não fomos capazes de detectar na escala de 6 h ou por causa de alguma limitação da técnica de binding, mas detectamos a diminuição da participação funcional deste subtipo na CE distal inflamada. Por outro lado, os α_{1D} -ARs, suposta e majoritariamente em espaço subcelular, seriam recrutados para a membrana por um mediador dependente de NFkB (ou que pelo menos é inibido pelo PDTC), explicando o envolvimento desse subtipo na contração da CE distal inflamada.

Considerando o importante papel da testosterona para o desenvolvimento do epidídimo e o impacto de andrógenos na expressão e função dos α_1 -ARs (Pupo, 1998; Mendes *et al.*, 2004), poderíamos questionar se a heterogeneidade de α_{1A}/α_{1D} -ARs na CE

distal inflamada é resultado de alguma alteração do nível de testosterona potencialmente causada pelo LPS. Contudo, estudo prévio com epididimite induzida por injeção intraductal de LPS demonstrou que os níveis plasmáticos de testosterona não estavam alterados 1, 7 e 15 dias após o tratamento com a endotoxina (Silva *et al.*, 2018), indicando que a plasticidade de α_1 -ARs possivelmente não foi dependente desse hormônio.

Presumivelmente, os α_{1B} -ARs poderiam ser investigados em nossos ensaios. Um dos possíveis antagonistas que poderia ser utilizado seria a cloroetilclonidina (CEC), um ligante que alquila α_{1B} -ARs, mas também α_{1D} -ARs, com cinética maior em relação ao α_{1A} -ARs (Xiao *et al.*, 1998). No entanto, em razão do tempo de incubação do ligante requerido para ensaio de binding, a CEC poderia alquilar todos os subtipos de adrenoceptores acessíveis independente do subtipo (Hirasawa *et al.*, 1997). O L-765,314, um ligante com razoável seletividade para α_{1B} -ARs em relação à α_{1A} -ARs (α_{1B}/α_{1A}), também poderia ser alternativamente utilizado para investigar os α_{1B} -ARs na CE distal inflamada, porém apresenta uma baixa relação de afinidade α_{1B}/α_{1D} (~10 vezes) (Patane *et al.*, 1998). Em conjunto, o limitado número de ligantes α_{1B} -seletivos não permitiria uma discriminação decisiva deste subtipo nos sistemas e circunstâncias aqui estudados.

É sabido que fibras simpáticas fornecem inervação para todas as regiões do epidídimo, e que a CE é mais densamente innervada em relação às regiões proximais (Ricker, 1998), controlando as contrações do músculo liso do ducto epididimário principalmente por α_1 -ARs (Ventura *et al.*, 1991). Consistentemente, alterações no sistema simpático podem interferir no tempo de trânsito de espermatozoide. Por exemplo, a simpatectomia química induzida por guanetidina (6,25 mg/kg) provocou um atraso no trânsito espermático (Kempinas *et al.*, 1998b), enquanto que a sibutramina (10 mg/kg), um inibidor não-seletivo da recaptação de noradrenalina e serotonina com efeito simpatomimético, acelerou o trânsito (Bellentani *et al.*, 2011), sugerindo que, além de regular a emissão seminal, neurotransmissores simpáticos estão envolvidos no trânsito espermático. Silva *et al.* (2018) reportaram que a epididimite aguda induzida por LPS diminuiu o tempo de trânsito na cabeça/corpo 7 dias após a injeção

intraductal da endotoxina, enquanto que na CE a aceleração foi detectada 1, 7 e 14 dias após o tratamento com LPS. Considerando o exposto acima, essas observações poderiam estar relacionadas à sinalização simpática pós-sináptica na CE?

Usando o mesmo método de indução de epididimite, nossos resultados indicaram uma população heterogênea de α_1 -ARs, composta de α_{1A} - e α_{1D} -ARs, envolvidas na contração da CE distal. Apesar de termos selecionado uma escala de 6 h após o tratamento com LPS, propomos que as fases iniciais da inflamação induz essa plasticidade de α_1 -ARs, contribuindo para elevação do tônus da CE e, em paralelo, explicando a aceleração duradoura e intensa observada na CE por (Silva *et al.*, 2018). Em um outro modelo de epididimite em camundongo, três dias após a injeção intraductal de bactéria *E. coli* uropatogênica a camada de músculo liso na CE distal ficou mais espessa, e regiões contíguas demonstraram uma diminuição do ducto epididimário, provavelmente restringindo a ascensão de bactérias para regiões proximais (Stammler *et al.*, 2015). Consonante a isso, sugerimos que a heterogeneidade de α_1 -ARs durante a fase inicial da inflamação induzida por LPS de *E. coli* possivelmente contribui para a contração do ducto, evitando a ascensão ou até mesmo expulsar da ameaça do órgão.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que na fase aguda da epididimite induzida por LPS há alteração dos subtipos de α_1 -ARs funcionais na CE distal, correlacionando-se com: i) a hipersensibilidade noradrenérgica; ii) um efeito independente de respostas sistêmicas, porém iii) dependente da sinalização de NF κ B.

Em conjunto, propomos que essa população heterogênea de α_1 -ARs pode levar ao aumento da constrição do ducto epididimário e, dessa forma, prover um mecanismo de resposta protetora da CE para evitar a ascensão bacteriana para regiões proximais do epidídimo e com a aceleração do trânsito de espermatozoides, previamente descritas.

Este trabalho contribui para entendimento da complexa rede de sinalização ativada pelos α_1 -ARs e para o entendimento do impacto de eventos das fases iniciais da inflamação durante a epididimite e na fertilidade masculina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboud R, Shafii M, Docherty JR (1993). Investigation of the subtypes of alpha 1-adrenoceptor mediating contractions of rat aorta, vas deferens and spleen. *Br J Pharmacol* **109**(1): 80-87.
- Akinaga J, García-Sáinz JA, Pupo AS (2019). Updates in the Function and Regulation of α 1-Adrenoceptors. *Br J Pharmacol*: 1-15.
- Anton PG, Duncan ME, McGrath JC (1977). An analysis of the anatomical basis for the mechanical response to motor nerve stimulation of the rat vas deferens. *J Physiol* **273**(1): 23-43.
- Arunlakshana O, Schild HO (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* **14**(1): 48-58.
- Avellar MCW, Hinton B (2018). Epididymis. In. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, edn, Vol. 2: Elsevier. p[^]pp 807-813.
- Bauer RM, Strittmatter F, Gratzke C, Göttinger J, Schlenker B, Reich O, *et al.* (2011). Coupling of α 1-Adrenoceptors to ERK1/2 in the Human Prostate. *Urologia Internationalis* **86**(4): 427-433.
- Belleannée C, Thimon V, Sullivan R (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and Tissue Research* **349**(3): 717-731.
- Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Pacini ESA, Kiguti LRA, Pupo AS, *et al.* (2011). Acceleration of Sperm Transit Time and Reduction of Sperm Reserves in the Epididymis of Rats Exposed to Sibutramine. *J Androl* **32**(6): 718-724.
- Black JW, Duncan WAM, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM (1972). Definition and Antagonism of Histamine H₂-receptors. *Nature* **236**(5347): 385-390.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Bremner JB, Coban B, Griffith R, Groenewoud KM, Yates BF (2000). Ligand design for α 1 adrenoceptor subtype selective antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **8**(1): 201-214.
- Bucher M, Kees F, Taeger K, Kurtz A (2003). Cytokines down-regulate α 1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Critical Care Medicine* **31**(2): 566-571.

Burt RP, Chapple CR, Marshall I (1995). Evidence for a functional alpha 1A- (alpha 1C-) adrenoceptor mediating contraction of the rat epididymal vas deferens and an alpha 1B- adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. *Br J Pharmacol* **115**(3): 467-475.

Bylund DB, Blaxall HS, Iversen LJ, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lomasney JW (1992). Pharmacological characteristics of alpha 2-adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning. *Mol Pharmacol* **42**(1): 1.

Calzada BC, Artiñano AA (2001). Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacological Research* **44**(3): 195-208.

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

Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, García-Cazarín ML, Tsujimoto G, Piascik MT (2002). Differences in the Cellular Localization and Agonist-Mediated Internalization Properties of the α_1 -Adrenoceptor Subtypes. *Mol Pharmacol* **61**(5): 1008-1016.

Cheng L, Chen Q, Zhu W, Wu H, Wang Q, Zhao X, *et al.* (2016). Toll-like Receptors 4 and 5 Cooperatively Initiate the Innate Immune Responses to Uropathogenic Escherichia coli Infection in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *Biol Reprod* **94**(3).

Chung KC, Park JH, Kim CH, Lee HW, Sato N, Uchiyama Y, *et al.* (2000). Novel biphasic effect of pyrrolidine dithiocarbamate on neuronal cell viability is mediated by the differential regulation of intracellular zinc and copper ion levels, NF-kb, and MAP kinases. *Journal of Neuroscience Research* **59**(1): 117-125.

Cianchetti S, Cardini C, Corti A, Menegazzi M, Darra E, Ingrassia E, *et al.* (2018). The beclomethasone anti-inflammatory effect occurs in cell/mediator-dependent manner and is additively enhanced by formoterol: NFkB, p38, PKA analysis. *Life Sci* **203**: 27-38.

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

Cornwall GA (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update* **15**(2): 213-227.

Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker H-C, Wildgruber M, Hill E, Brown D, *et al.* (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction (Cambridge, England)* **141**(5): 653-663.

Docherty JR (1998). Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **361**: 1-15.

Docherty JR (2010). Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 405-417.

Doxey JC, Lane AC, Roach AG, Virdee NK (1984). *Comparison of the alpha-adrenoceptor antagonist profiles of idazoxan (RX 781094), yohimbine, rauwolscine and corynanthine*. edn, vol. 325.

Elfgen V, Mietens A, Mewe M, Hau T, Middendorff R (2018). Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. *Reproduction* **156**(4): R125-R141.

Eltze M (1996). Functional evidence for an alpha 1B-adrenoceptor mediating contraction of the mouse spleen. *Eur J Pharmacol* **311**(2-3): 187-198.

Eltze M, König H, Ullrich B, Grebe T (1999). Buspirone functionally discriminates tissues endowed with α 1-adrenoceptor subtypes A, B, D and L. *Eur J Pharmacol* **378**(1): 69-83.

Ernst O, Zor T (2010). Linearization of the bradford protein assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*: 1-6.

Faure C, Pimoule C, Arbilla S, Langer SZ, Graham D (1994a). Expression of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat tissues: implications for alpha 1-adrenoceptor classification. *Eur J Pharmacol* **268**(2): 141-149.

Faure C, Pimoule C, Vallancien G, Langer SZ, Graham D (1994b). Identification of α 1-adrenoceptor subtypes present in the human prostate. *Life Sci* **54**(21): 1595-1605.

Ferguson SSG (2001). Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling. *Pharmacol Rev* **53**(1): 1.

Fernandez CDB, Porto EM, Arena AC, Kempinas WDG (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology* **31**(4): 427-437.

Fijak M, Bhushan S, Michel V, Nicolas N, Meinhardt A, Pilatz A, *et al.* (2018). Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Human Reproduction Update* **24**(4): 416-441.

Forray C, Bard JA, Wetzel JM, Chiu G, Shapiro E, Tang R, *et al.* (1994). The alpha 1-adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human alpha 1c subtype. *Mol Pharmacol* **45**(4): 703.

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

Gray K, Short J, Ventura S (2008). The α 1A-adrenoceptor gene is required for the α 1L-adrenoceptor-mediated response in isolated preparations of the mouse prostate. *Br J Pharmacol* **155**(1): 103-109.

Hague C, Chen Z, Pupo AS, Schulte NA, Toews ML, Minneman KP (2004). The N Terminus of the Human α 1D-Adrenergic Receptor Prevents Cell Surface Expression. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(1): 388-397.

Haidl G, Allam JP, Schuppe HC (2008). Chronic epididymitis: Impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* **40**: 92-96.

Hall SH, Hamil KG, French FS (2002). Host Defense Proteins of the Male Reproductive Tract. *J Androl* **23**(5): 585-597.

Han C, Li Y, Wang Y, Cui D, Luo T, Zhang Y, *et al.* (2018). Development of Inflammatory Immune Response-Related Drugs Based on G Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Cellular Physiology and Biochemistry* **51**(2): 729-745.

Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Cogé F, Guénin S-P, Schwinn DA (2004). Update on human α 1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**(9): 449-455.

Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, *et al.* (2003). Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. *The EMBO Journal* **22**(13): 3356-3366.

Hedger MP (2011). Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. *J Androl* **32**: 625-640.

Hedger MP, Hales DB (2006). Immunophysiology of the Male Reproductive Tract. In: *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, edn. St. Louis, MO, USA: Elsevier. p[^]pp.

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

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

Hinton BT, Palladino MA (1995). Epididymal epithelium: Its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy Research and Technique* **30**(1): 67-81.

Hirasawa A, Sugawara T, Awaji T, Tsumaya K, Ito H, Tsujimoto G (1997). Subtype-Specific Differences in Subcellular Localization of α 1-Adrenoceptors: Chlorethylclonidine Preferentially Alkylates the Accessible Cell Surface α 1-Adrenoceptors Irrespective of the Subtype. *Mol Pharmacol* **52**(5): 764.

Hu Z-W, Shi X-Y, Lin RZ, Chen J, Hoffman BB (1999). α 1-Adrenergic Receptor Stimulation of Mitogenesis in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Tyrosine Protein Kinases and Calcium in Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Pharmacol Exp Ther* **290**(1): 28-37.

Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, *et al.* (2007). The Rat Epididymal Transcriptome: Comparison of Segmental Gene Expression in the Rat and Mouse Epididymides¹. *Biol Reprod* **76**(4): 561-570.

Kamikihara SY, Lima V, Silva ART, Bazzo I, Pupo S (2005). Differential Distribution of Functional α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes along the Rat Tail Artery. *Pharmacology* **314**: 753-761.

Kamikihara SY, Mueller A, Lima V, Akinaga J, Nojimoto FD, Castilho A, *et al.* (2007). Alpha1-Adrenoceptors in Proximal Segments of Tail Arteries From Control and Reserpinised Rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **376**: 117-126.

Kandasamy K, Choudhury S, Singh V, Addison MP, Darzi SA, Kasa JK, *et al.* (2015). Erythropoietin Reverses Sepsis-Induced Vasoplegia to Norepinephrine Through Preservation of α 1D-Adrenoceptor mRNA Expression and Inhibition of GRK2-Mediated Desensitization in Mouse Aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* **21**(1): 100-113.

Kato J, Agalave NM, Svensson CI (2016). Pattern recognition receptors in chronic pain: Mechanisms and therapeutic implications. *Eur J Pharmacol* **788**: 261-273.

Kawai T, Akira S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**: 373.

Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, *et al.* (1998a). Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* **59**(4): 897-904.

Kempinas WDG, Klinefelter GR, Ferrell J, Goldman JM, Suarez JD, Strader L, *et al.* (1998b). Rat Epididymal Sperm Quantity, Quality, and Transit Time after Guanethidine-Induced Sympathectomy¹. *Biol Reprod* **59**(4): 890-896.

Kenakin T, Jenkinson S, Watson C (2006). Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2): 710-723.

Kenakin TP (1982). The Schild regression in the process of receptor classification. *Can J Physiol Pharmacol* **60**(3): 249-265.

Kleibeuker W, Ledeboer A, Eijkelkamp N, Watkins LR, Maier SF, Zijlstra J, *et al.* (2007). A role for G protein-coupled receptor kinase 2 in mechanical allodynia. *The European journal of neuroscience* **25**: 1696-1704.

- Kolbeck SC, Steers WD (1993). Origin of Neurons Supplying the Vas Deferens of the Rat. *J Urol* **149**(4): 918-921.
- Lamano Carvalho TL, Hodson NP, Blank MA, Watson PF, Mulderry PK, Bishop AE, *et al.* (1986). Occurrence, distribution and origin of peptide-containing nerves of guinea-pig and rat male genitalia and the effects of denervation on sperm characteristics. *J Anat* **149**: 121-141.
- Langer SZ (1999). History and Nomenclature of $\alpha 1$ -Adrenoceptors. *Eur Urol* **36**(suppl 1)(Suppl. 1): 2-6.
- Lefkowitz RJ (2004). Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**(8): 413-422.
- Liang J-L, Yang G-M, Li T, Liu L-M (2014). Interleukin 1 β attenuates vascular $\alpha 1$ adrenergic receptors expression following lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rabbits: Involvement of JAK2-STAT3 pathway. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **76**(3): 762-770.
- Loniewski K, Shi Y, Pestka J, Parameswaran N (2008). Toll-like receptors differentially regulate GPCR kinases and arrestins in primary macrophages. *Molecular Immunology* **45**: 2312-2322.
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**(2): 145-151.
- Maeshima N, Fernandez R (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**(3).
- Maróstica E, Avellar MCW, Porto CS (2005). Effects of testosterone on muscarinic acetylcholine receptors in the rat epididymis. *Life Sci* **77**(6): 656-669.
- Mendes FR, Hamamura M, Queiróz DBC, Porto CS, Avellar MCW (2004). Effects of androgen manipulation on $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in the rat seminal vesicle. *Life Sci* **75**(12): 1449-1463.
- Mewe M, Wulfsen I, Middendorff R, Bauer CK (2007). Differential modulation of bovine epididymal activity by oxytocin and noradrenaline. *Reproduction* **134**: 493-501.
- Michel V, Duan Y, Stoschek E, Bhushan S, Middendorff R, Young JM, *et al.* (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* causes fibrotic remodelling of the epididymis. *The Journal of Pathology* **240**(1): 15-24.
- Michel V, Pilatz A, Hedger MP, Meinhardt A (2015). Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. *Asian Journal of Andrology* **0**: 0.
- Minneman KP (1988). Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol Rev* **40**: 87-119.

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

Mitchell GaG (1935). The Innervation of the Kidney, Ureter, Testicle and Epididymis. *J Anat* **70**: 10-32.15.

Morais PDL, Campos M, Pupo AS (2002). Effects of castration on α 1-adrenoceptor subtypes in the rat aorta. *Vascular Pharmacology* **39**: 335-341.

Mueller A, Pupo A Investigação dos adrenoceptores-alpha1 envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela noradrenalina no ducto deferente, báculo e aorta de rato. Master degree, UNESP, Botucatu, 2005.

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

Nicholson A, Rait G, Murray-Thomas T, Hughes G, Mercer CH, Cassell J (2010). Management of epididymo-orchitis in primary care: results from a large UK primary care database. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* **60**(579): e407-e422.

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

Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(19): 7421.

Pacini ESA, Castilho ACS, Hebeler-Barbosa F, Pupo AS, Kiguti LRA (2018). Contraction of rat cauda epididymis smooth muscle to α 1-adrenoceptor activation is mediated by α 1A-adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther*.

Palladino MA, Johnson TA, Gupta R, Chapman JL, Ojha P (2007). Members of the Toll-Like Receptor Family of Innate Immunity Pattern-Recognition Receptors Are Abundant in the Male Rat Reproductive Tract1. *Biol Reprod* **76**(6): 958-964.

Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi M-K, Plaska D (2008). Localization of Toll-Like Receptors on Epididymal Epithelial Cells and Spermatozoa. *American Journal of Reproductive Immunology* **60**(6): 541-555.

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**: 1191.

Patane MA, Scott AL, Broten TP, Chang RSL, Ransom RW, DiSalvo J, *et al.* (1998). 4-Amino-2-[4-[1-(benzyloxycarbonyl)-2(S)- [[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]- piperazinyl]-6,7-dimethoxyquinazoline (L-765,314): A Potent and Selective α 1b Adrenergic Receptor Antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* **41**(8): 1205-1208.

Patrão MTCC, Silva EJR, Avellar MCW (2009). Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **53**: 934-945.

Perez-Aso M, Segura V, Montó F, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, *et al.* (2013). The three α 1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**(10): 2322-2333.

Pfaffl MW, Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45.

Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Jr., Perez DM (1995). The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **275**(3): 1583-1589.

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

Pilatz A, Hossain H, Kaiser R, Mankertz A, Schüttler CG, Domann E, *et al.* (2015). Acute Epididymitis Revisited: Impact of Molecular Diagnostics on Etiology and Contemporary Guideline Recommendations. *Eur Urol* **68**(3): 428-435.

Pilatz A, Wagenlehner F, Bschleipfer T, Schuppe HC, Diemer T, Linn T, *et al.* (2013). Acute epididymitis in ultrasound: Results of a prospective study with baseline and follow-up investigations in 134 patients. *European Journal of Radiology* **82**(12): e762-e768.

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

Pupo AS, Cavenaghi DL, Campos M, Lucena Morais P, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A (1999). Effects of indoramin in rat vas deferens and aorta: concomitant alpha1-adrenoceptor and neuronal uptake blockade. *Br J Pharmacol* **127**(8): 1832-1836.

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

Queiróz DBC, Mendes FR, Porto CS, Avellar MCW (2002). Alpha1-adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biol Reprod* **66**: 508-515.

Raetz CRH, Whitfield C (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry* **71**: 635-700.

Ricker DD (1998). The Autonomic Innervation of the Epididymis: Its Effects on Epididymal Function and Fertility. *J Androl* **19**: 1-4.

Ricker DD, Crone JK, Chamness SL, Klinefelter GR, Chang TS (1997). Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *J Androl* **18**(2): 131-138.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, *et al.* (1993). The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* **187**(3): 169-190.

Robaire B, Hinton B (2015). The Epididymis. In, edn, Vol. 1. pp 691-771.

Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist M-C (2006). The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*: 1071-1148.

Robaire B, Seenundun S, Hamzeh M, Lamour S-A (2007). *Androgenic regulation of novel genes in the epididymis*. edn, vol. 9.

Rodrigues A, Queiróz DBC, Silva EJR, Honda L, Avellar MCW, Hall SH (2008). Activation of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) by In Vivo and In Vitro Exposure of Rat Epididymis to Lipopolysaccharide from Escherichia Coli1. *Biol Reprod* **79**(6): 1135-1147.

Roupe van der Voort C, Heijnen CJ, Wulffraat N, Kuis W, Kavelaars A (2000). Stress induces increases in IL-6 production by leucocytes of patients with the chronic inflammatory disease juvenile rheumatoid arthritis: a putative role for α_1 -adrenergic receptors. *Journal of Neuroimmunology* **110**(1): 223-229.

Sanbe a, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, *et al.* (2007). Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol* **152**: 332-340.

Schmidt C, Kurt B, Höcherl K, Bucher M (2009). Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. *Shock* **32**(3): 239-246.

Shima S (1993). Characterization of Adrenergic Receptors in Membranes from the Rat Seminal Vesicle. *The Japanese Journal of Pharmacology* **61**(2): 87-92.

Silva AM, Queiróz DBC, Neto EFC, Naffah-Mazzacoratti MdG, Godinho RO, Porto CS, *et al.* (2002). Segment-Specific Decrease of Both Catecholamine Concentration and Acetylcholinesterase Activity Are Accompanied by Nerve Refinement in the Rat Cauda Epididymis During Sexual Maturation. *J Androl* **23**(3): 374-383.

Silva EJR, Ribeiro CM, Mirim AFM, Silva AAS, Romano RM, Hallak J, *et al.* (2018). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulate epididymal cytokine and

chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis. *Scientific Reports* **8**: 103.

Solomon HM, Wier PJ, Ippolito DL, Toscano TV (1997). Effect of prazosin on sperm transport in male rats. *Reprod Toxicol* **11**(4): 627-631.

Stammiller A, Hau T, Bhushan S, Meinhardt A, Jonigk D, Middendorff R, *et al.* (2015). Epididymitis : ascending infection restricted by segmental boundaries. **30**: 1557-1565.

Taki N, Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Israilova M, Taniguchi T, *et al.* (2004). Alpha-1D adrenoceptors are involved in reserpine-induced supersensitivity of rat tail artery. *Br J Pharmacol* **142**(4): 647-656.

Tracy CR, Steers WD, Costabile R (2008). Diagnosis and Management of Epididymitis. *Urologic Clinics of North America* **35**: 101-108.

Trojian TH, Lishnak TS, Heiman D (2009). Epididymitis and orchitis: An overview. *American Family Physician* **79**: 583-587.

Turner TT (1995). On the Epididymis and its Role in the Development of the Fertile Ejaculate. *J Androl* **16**(4): 292-298.

Turner TT (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* **29**: 237-250.

Turner TT, Ewing LL, Jones CE, Howards SS, Zegeye B (1985). Androgens in male rat reproductive tract fluids: hypophysectomy and steroid replacement. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **248**(3): E274-E280.

Van Rossum JM (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.

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

Villalobos-Molina R, Ibarra M (1996). Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol* **298**(3): 257-263.

von Zastrow M, Link R, Daunt D, Barsh G, Kobilka B (1993). Subtype-specific differences in the intracellular sorting of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* **268**(2): 763-766.

White CW, Choong Y-T, Short JL, Exintaris B, Malone DT, Allen AM, *et al.* (2013). Male contraception via simultaneous knockout of α 1A-adrenoceptors and P2X1-purinoceptors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 20825-20830.

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

Wu D, Katz a, Lee CH, Simon MI (1992). Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *The Journal of biological chemistry* **267**: 25798-25802.

Xiao L, Jeffries WB (1998). Kinetics of alkylation of cloned rat α 1-adrenoceptor subtypes by chloroethylclonidine. *Eur J Pharmacol* **347**(2): 319-327.

Yono M, Latifpour J, Yamamoto Y, Imanishi A, Yoshida M (2008). Region and age dependent differences in alpha1-adrenergic responsiveness of rat seminal vesicle and vas deferens. *Eur J Pharmacol* **587**: 291-295.

Zhang J-j, Xu Z-m, Zhang C-m, Dai H-y, Ji X-q, Wang X-f, *et al.* (2010). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor- κ B pathway activation, and regulates adhesion, migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **17**(3): 175-181.

Zhong H, Lee D, Robeva A, Minneman KP (2001). Signaling pathways activated by α 1-adrenergic receptor subtypes in PC12 cells. *Life Sci* **68**(19): 2269-2276.

Zhong H, Minneman KP (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **375**(1-3): 261-276.

Zhu W, Zhao S, Liu Z, Cheng L, Wang Q, Yan K, *et al.* (2015). Pattern Recognition Receptor–Initiated Innate Antiviral Responses in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* **194**(10): 4825-4835.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Contractile Effects of Serotonin (5-HT) in the Rat Cauda Epididymis: Expression and Functional Characterization of 5-HT Receptors

Andre Mueller, Luiz R. A. Kiguti,¹  Erick J. R. Silva, and André S. Pupo

Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu-São Paulo, Brazil

Received October 4, 2018; accepted January 28, 2019

ABSTRACT

Serotonin [5-hydroxytryptamine (5-HT)] exerts multiple central and peripheral functions. High concentrations of 5-HT have been found in the epididymis, a ductal organ that plays pivotal roles in sperm transport and maturation. The contraction of the epididymal smooth muscle is essential for sperm transport and emission during ejaculation. The contributions of the epididymal 5-HT system to these events are poorly understood. Here, we assessed the contractile function of 5-HT in the rat cauda epididymis (CE), pharmacologically targeting the receptor(s) and the reuptake mechanism involved in this system. Segments of CE duct from adult Wistar rats were set up in an organ bath system for isometric tension recordings, and concentration-response curves to 5-HT and norepinephrine were obtained. 5-HT elicited concentration-dependent contractions of the CE duct ($pEC_{50} = 6.5 \pm 0.1$) that were potentiated

with high potency by the norepinephrine transporter (NET) inhibitor desipramine and with low potency by the highly selective serotonin transporter inhibitor paroxetine, indicating that the NET is the major mediator of 5-HT reuptake in vitro. CE contractions to 5-HT were antagonized by the α_1 -adrenoceptor (α_1 -AR) antagonist prazosin ($pA_2 \cong 8.9$), 5-HT_{2A/2C} antagonists ketanserin ($pA_2 \cong 9.4$) and fluoxetine ($pA_2 \cong 7.4$), and 5-HT_{1A} ligands WAY 100635 ($pA_2 \cong 8.9$) and buspirone ($pA_2 \cong 7.3$). Reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis demonstrated that 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} transcripts are highly abundant in the cauda epididymis, whereas 5-HT_{2C} transcript was not found. Altogether, our results reveal that contractions of the CE duct to 5-HT encompasses at least activation of α_1 -ARs and 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, providing new insights into the roles of 5-HT on the epididymal function.

Introduction

Serotonin [5-hydroxytryptamine (5-HT)] is a largely distributed biogenic monoamine exerting several effects in both neuronal and non-neuronal tissues. In the central nervous system 5-HT controls behavioral processes and other functions such as emesis, body temperature, ejaculation, and circadian rhythms (Berger et al., 2009). Outside the central nervous system 5-HT is involved in a number of functions, such as vasoconstriction, nociception, intestinal motility and secretion, platelet aggregation, uterine smooth muscle contraction, among others (Hoyer et al., 1994; Berger et al., 2009). This myriad of actions of 5-HT are mediated by interactions with 14 different 5-HT receptors, which are classified into seven families (5-HT_{1–7}). All 5-HT receptors are metabotropic seven transmembrane domain receptors (or G protein-coupled

receptors) (Alexander et al., 2017a), with the exception of 5-HT₃, which is an ionotropic (cation-permeable) receptor (Alexander et al., 2017b). The variety of 5-HT receptor subtypes reflects the extraordinary biologic relevance of 5-HT as a neurotransmitter, as well as a paracrine and autocrine signaling molecule.

Concerning the metabotropic 5-HT receptors, the 5-HT₁ and 5-HT₂ classes are comprised of five (5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F) and three (5-HT_{2A}, 2B, 2C) subtypes, respectively (Hannon and Hoyer, 2008; Alexander et al., 2017a). In agreement with the widespread distribution of 5-HT receptors, the 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} subtypes have been described in male reproductive tissues. 5-HT is known to regulate testicular blood flow and testosterone secretion (Kinson et al., 1973), and to contract the smooth muscle of male reproductive organs, such as the seminal vesicle (Kim and Paick, 2004), vas deferens (Hay and Wadsworth, 1982; Campos et al., 1999; Pedroso et al., 2017), and prostate (Steidle et al., 1989), through activation of the 5-HT₁ and/or 5-HT₂ receptor subtypes. Interestingly, high concentrations of 5-HT have been found in the epididymis, a ductal organ that plays a crucial role in sperm transport, concentration, maturation, and storage until ejaculation (Korman and Penttilä, 1968; Anderson et al., 1979). Jiménez-Trejo et al. (2007) revealed that the rat caput

This work was supported by São Paulo Research Foundation [Grants 2017/15175-1 and 2015/08227-0]. This study was supported in part by the Federal University of Mato Grosso and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brazil [Finance Code 001].

¹Current affiliation: Department of Pharmacology, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil.

A.M. and L.R.A.K. contributed equally to this work as first authors.

E.J.R.S. and A.S.P. contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1124/jpet.118.254110>

ABBREVIATIONS: AR, adrenoceptor; CE, cauda epididymis; CR, concentration ratio; CRC, concentration-response curve; E_{max} , maximal response; 5-HT, serotonin (5-hydroxytryptamine); NET, norepinephrine transporter; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SERT, serotonin transporter; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor.

epididymis possesses a local serotonergic system that includes the expression of 5-HT biosynthetic enzymes, 5-HT receptors (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, etc.), and serotonin transporters by epididymal epithelial and non-epithelial cells. Notwithstanding, the contribution of 5-HT to epididymal physiology is still poorly understood.

It has been reported that 5-HT stimulates anion secretion via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptors in rat cauda epididymal cell primary cultures (Leung et al., 1999), suggesting that 5-HT plays a role in the regulation of epididymal luminal content and sperm quiescence during storage in the epididymis. Furthermore, administration of exogenous 5-HT in rats resulted in fluid accumulation in the epididymis (Singh et al., 1987). In men, high blood 5-HT levels were associated with poor sperm count and motility (Gonzales et al., 1992), and treatment with the antidepressant paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), caused ejaculatory difficulties and increased sperm DNA fragmentation (Tanrikut et al., 2010). Despite these negative outcomes, SSRIs, such as dapoxetine, can be used in the pharmacotherapy of premature ejaculation (Giuliano and Clément, 2005; Rowland et al., 2010; Abu El-Hamd and Abdelhamed, 2018). It is thought that the effects of SSRIs on the regulation of ejaculatory function are mediated by increasing 5-HT signaling in the central nervous system. Nevertheless, peripheral mechanisms in the male reproductive organs could also be involved in these clinical outcomes (Jannini et al., 2015).

Epididymal epithelial cells are surrounded by a smooth muscle layer, in which the thickness increases from the proximal (caput) to distal (cauda) epididymis. In the cauda epididymis (CE), the thicker smooth muscle layer is densely innervated by postganglionic sympathetic nerve fibers that release norepinephrine (Ricker, 1998; Silva et al., 2010). These sympathetic nerve fibers play a crucial role in the contraction of the CE smooth muscle, which is paramount for sperm transport during the emission phase of ejaculation and hence for reproduction (Ricker et al., 1997; Pacini et al., 2018). Likewise, the presence of a dense network of serotonergic nerve fibers has been detected in the CE (Leung et al., 1999), although the role of 5-HT in the contraction of the epididymal smooth muscle remains elusive.

Taking this into account and considering: 1) the ability of 5-HT to contract smooth muscle in reproductive organs, 2) the existence of a local serotonergic system in the epididymis, and 3) the reproductive outcomes of SSRI drugs, we hypothesized that 5-HT contracts CE smooth muscle. Thus, we systematically assessed the contractions induced by 5-HT in the rat CE smooth muscle *in vitro*, and investigated the roles of 5-HT receptor subtypes and reuptake systems in the pharmacological events mediated by 5-HT in this tissue.

Materials and Methods

Animals and Drugs. Adult male Wistar rats (90–150 days old) were maintained under controlled conditions (12-hour/12-hour light/dark cycle, 25 ± 2°C, and 40%–70% humidity) with food and water *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Experimental Animals from the Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (Process No. 749/15) and were in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health) and Animal in Research: Reporting *In Vivo* Experiments guidelines (Kilkenny et al.,

2010). The drugs used in the experiments were obtained from the following sources: L-(–)-norepinephrine bitartrate salt monohydrate, serotonin HCl, ketanserin tartrate, WAY 100635, buspirone, and corticosterone were purchased from Sigma; fluoxetine HCl was purchased from Fagron; paroxetine was purchased from Tocris; and desipramine HCl, prazosin HCl, yohimbine HCl, and (±)-propranolol HCl were purchased from Research Biochemicals Inc.

In Vitro Contraction Studies. Contraction experiments were conducted following the procedure detailed in Pacini et al. (2018). Rats were killed by decapitation and the epididymis was carefully excised. The CE was uncoiled, cleaned of adherent tissues, and freed from intraluminal content by flushing 1 ml of nutrient solution through a blunt-ended 30 gauge needle. For digital recording of isometric contractions, segments of the distal CE (~1.0 cm in length), corresponding to region 19 according to Jelinsky et al. (2007), were mounted in organ baths under 1.0 g of resting tension in a modified Tyrode's solution (138 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.36 mM NaH₂PO₄, 15 mM NaHCO₃, and 5.5 mM dextrose) prepared in glass-distilled deionized water, maintained at 30°C and pH 7.4, and continuously bubbled with 95% O₂/5% CO₂. After a 30-minute stabilization period, CE segments were challenged with 80 mM KCl until reproducible contractions were obtained. Then, cumulative concentration-response curves (CRCs) to norepinephrine or 5-HT were obtained and taken as control curves. All curves were conducted in the presence of a cocktail of inhibitors containing corticosterone (10 μM), yohimbine (0.1 μM), and propranolol (0.1 μM) to block the monoamine uptake not mediated by the norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), and α₂- and β-adrenoceptors (ARs), respectively.

To investigate the role of the NET and/or SERT, CRCs to 5-HT and norepinephrine were built up in the presence of fluoxetine, paroxetine (selective SERT inhibitors), and desipramine (selective NET inhibitor). The involvement of α₁-ARs was investigated using prazosin (α₁-AR antagonist) and that of 5-HT receptors was investigated using ketanserin (5-HT_{2A/2C} antagonist), WAY 100635 (5-HT_{1A} antagonist), buspirone (5-HT_{1A} partial agonist), or fluoxetine (SERT inhibitor with high affinity for 5-HT_{2A/2C}). All inhibitors/antagonists were previously incubated for 45 minutes to allow equilibration, and then a new CRC to either norepinephrine or 5-HT was obtained. Contractions were expressed as percentage of maximal contraction of the control curves. The potencies of norepinephrine and 5-HT in the absence and presence of antagonists are presented as pEC₅₀ values, i.e., the negative logarithm of the concentration of 5-HT or norepinephrine producing 50% of its maximal response (*E*_{max}). The effects of each concentration of norepinephrine or 5-HT were measured as the peak of the respective induced contraction of agonist.

Schild Analysis. Antagonist potencies and affinities were evaluated by Schild analysis (Arunlakshana and Schild, 1959). The parallel rightward displacements induced by each antagonist concentration on 5HT or norepinephrine CRCs were quantified and used to calculate the concentration ratio (CR), which is the ratio between equieffective norepinephrine or 5-HT concentrations in the presence and absence of antagonist. The CR was plotted as log (CR – 1) versus the respective antagonist concentration in a Schild plot and analyzed by linear regression. The slopes of linear regressions were calculated, and when not different from unity the intercept in abscissa (pA₂) was taken as the antagonist dissociation constant (pK_B). However, as in most assays, since the slopes in the Schild plots were much lower than 1.0, the pA₂ values were taken as estimates of antagonist potencies calculated from the formula pA₂ = log (CR – 1) – log [B], where [B] is the lowest effective antagonist concentration.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect each specific gene target. Total RNA from epididymal regions (initial segment, caput, corpus, and cauda), testis, and brain was extracted using TRIzol Reagent (ThermoFisher) according to the manufacturer's instruction, followed by DNase treatment (DNase I Amplification Grade; Invitrogen) and first strand cDNA synthesis

(Thermoscript RT-PCR kit; Invitrogen). Oligo(dT)-primed cDNA was synthesized from total RNA (2 μ g) for 1 hour at 55°C in a reaction volume of 20 μ l. The resulting cDNA (2 μ l) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) (SimpliAmp; Applied Biosystems) in a final volume of 20 μ l containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate, 1 U *Thermus aquaticus* DNA polymerase, and 0.4 μ M of each sense and antisense primer used to amplify specific nucleotide sequences present in *Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2b*, *Htr2c*, and *Ppia* transcripts. Primer sequences, GenBank accession numbers, corresponding base sites, sizes of the PCR products, and PCR conditions are given in Table 1. Primers for *Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2b*, *Htr2c*, and *Ppia* were designed using Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and spanned at least one intron to ensure that PCR products were from cDNA and not genomic DNA. Primers for *Htr2a* were designed as described by Reist et al. (2003). Routinely, no-template negative control PCR reactions were performed to assess genomic DNA contamination in the template RNA. Positive control was employed to check that the PCR conditions used could successfully amplify the target sequences. DNA samples (10 μ l) were loaded onto agarose gels (1.5%, w/v) containing 10 μ g/ml Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) and the results were imaged using the G:BOX XR5 (Syngene) imaging system.

Statistical Analysis. Curve fitting was performed by nonlinear regression using the three-parameter logistic equation from GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA), and the $E_{\max}$, pEC₅₀, and pA₂ values were calculated accordingly. All values are shown as mean $\pm$ S.E.M. of n independent experiments. Differences between mean values were tested for statistical significance ($P < 0.05$) using ANOVA, followed by Dunnett's test for multiple comparisons.

Results

5-HT Contracts the Rat Cauda Epididymis Smooth Muscle. 5-HT elicited concentration-dependent contractions, presenting a pEC₅₀ value of 6.45 ± 0.14 and a maximal response that corresponded to $\sim 45\%$ of the norepinephrine $E_{\max}$ value (Fig. 1A). As shown in the typical recordings presented in Fig. 1, C and D, the contractions induced by 5-HT were less sustained than those produced by norepinephrine.

Uptake of 5-HT in the Rat Cauda Epididymis Is Mainly Driven by the NET Rather Than the SERT. To investigate the participation of the 5-HT reuptake system, CRCs to 5-HT were performed in the absence and presence of different concentrations of SERT inhibitors (Fig. 2) and the

influence of the reuptake was estimated in terms of agonist CRCs measured at the EC₅₀ values (Table 2).

At low concentrations (1–10 nM), both selective SERT inhibitors paroxetine and fluoxetine were ineffective in potentiating 5-HT-induced contractions in the CE duct (Fig. 2, A and E; Table 2). These low concentrations of both paroxetine and fluoxetine did not affect CRCs to norepinephrine (Fig. 2, B and F). However, at higher concentrations, 100–1000 nM of paroxetine increased the potency of 5-HT and norepinephrine by up to ~ 5 - and ~ 30 -fold, respectively (Fig. 2, C and D; Table 2). Conversely, 30–100 nM of fluoxetine reduced the potencies of 5-HT by up to ~ 3 -fold in the CE duct (Fig. 2G; Table 2); at such high concentrations, fluoxetine did not affect the potencies of norepinephrine in the CE duct (Fig. 2H; Table 2).

These data indicated that 5-HT is not taken up by the SERT in the CE duct, and that the NET could play such a role, as suggested by the effects of high concentrations of paroxetine on both 5-HT- and norepinephrine-induced contractions of the CE duct. We evaluated whether the NET could participate in the removal of 5-HT in the CE duct using the selective NET inhibitor desipramine. At concentrations of 10 and 30 nM, desipramine potentiated the effects of 5-HT in the CE duct by up to ~ 4 -fold (Fig. 2I; Table 2), whereas 10 nM of desipramine potentiated the effects of norepinephrine by ~ 10 -fold (Fig. 2J; Table 2).

α_1 -Adrenoceptors and 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} Receptors Are Involved in the 5-HT-Induced Contractions of the Rat Cauda Epididymis. To investigate the receptors involved in the contractions induced by 5-HT, CRCs were built in the absence and presence of selective antagonists. Since 5-HT has been shown to activate adrenoceptors (Innes, 1962; Purdy et al., 1987; Shaw et al., 2000), and considering that these receptors are abundantly expressed in the CE (Ventura and Pennefather, 1991; Queiróz et al., 2002; White et al., 2013; Pacini et al., 2018), we determined the effects of the selective α_1 -AR antagonist prazosin on 5-HT-induced contractions in the CE duct. In fact, low concentrations (3–100 nM) of prazosin antagonized the contractions induced by 5-HT with a potency measured as a pA₂ value of 8.89, which well correlated to the potency obtained against norepinephrine (pA₂ = 8.92) (Fig. 3; Table 3), indicating that α_1 -ARs are involved in the contractions induced by 5-HT. However, the slope in the Schild plot

TABLE 1
Primers and conditions for RT-PCR

Gene	Primer Sequence	Amplicon Size	Accession Number	Initial Denaturation	35 Cycles			Final Elongation
					Denaturation	Annealing	Elongation	
		bp		°C/min	°C/s	°C/s	°C/s	°C/min
<i>Htr1a</i>	Forward: 5'-GTCACCTGCGACCTGTTTAT-3'	286	NM_012585.1	95/2	95/60	58/60	72/90	72/3
	Reverse: 5'-CGAAAGTGGAGTAGATGGTGT-3'	286	NM_012585.1	95/2	95/60	58/60	72/90	72/3
<i>Htr1b</i>	Forward: 5'-CACTGATGCGGTGGACTATT-3'	217	NM_022225.1	95/2	95/60	58/60	72/75	72/3
	Reverse: 5'-GAGCAGGGTGGGTAAATAGAA-3'	217	NM_022225.1	95/2	95/60	58/60	72/75	72/3
<i>Htr2a</i>	Forward: 5'-AGCTGCAGAATGCCACCACTAT-3'	322	NM_017254.1	95/2	95/60	60/60	72/75	72/3
	Reverse: 5'-GGTATTGGCATGGATATACCTAC-3'	322	NM_017254.1	95/2	95/60	60/60	72/75	72/3
<i>Htr2b</i>	Forward: 5'-CTGTGCTCCTGCCTGTTATT-3'	224	NM_017250.1	95/2	95/60	58/60	72/75	72/3
	Reverse: 5'-TTGACCACATCAGCCTCTATTC-3'	224	NM_017250.1	95/2	95/60	58/60	72/75	72/3
<i>Htr2c</i>	Forward: 5'-GCTAGCGGGTTGTCAACTAT-3'	322	NM_012765.3	95/2	95/60	60/60	72/75	72/3
	Reverse: 5'-CGACGATTGAAAGTGCTGGC-3'	322	NM_012765.3	95/2	95/60	60/60	72/75	72/3
<i>Ppia</i>	Forward: 5'-AGCACTGGGGAGAAAGGATT-3'	174	NM_017101.1	95/2	95/60	60/45	72/60	72/3
	Reverse: 5'-GATGCCAGGACCTGTATGCT-3'	174	NM_017101.1	95/2	95/60	60/45	72/60	72/3

bp, base pair.

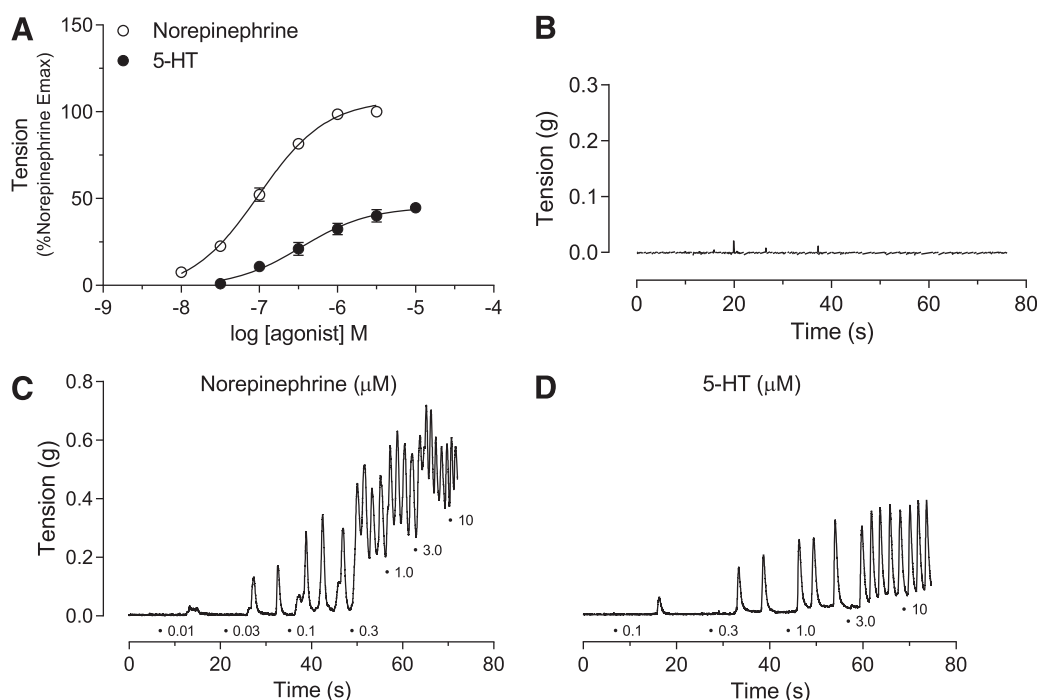


Fig. 1. Contractile effects of 5-HT and norepinephrine in the rat CE duct. (A) Mean concentration-response curves in the presence of cocktail of inhibitors for contractions induced by norepinephrine (○) and 5-HT (●), as measured by the peak of the phasic effect. Values represent mean $\pm$ S.E.M. of 11 and seven independent experiments to norepinephrine and 5-HT, respectively. (B) Representative recording of baseline before CRCs. (C and D) Representative recordings of contractions of the CE duct in vitro to norepinephrine and 5-HT, respectively.

for prazosin against 5-HT was much lower than theoretical unity (Fig. 3, A and C; Table 3), while the antagonism presented against norepinephrine was consistent with a competitive antagonism (Fig. 3, B and C; Table 3). Therefore, the effects of subtype-selective 5-HT receptor antagonists were evaluated in the presence of 100 nM prazosin to prevent activation of α_1 -ARs by 5-HT.

Increasing concentrations of the 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} receptor antagonist ketanserin (1–30 nM) produced rightward shifts on the CRCs to 5-HT, although insurmountable antagonism was observed with concentrations from 3 to 30 nM, which reduced the $E_{\max}$ value for 5-HT (Fig. 4A). To further investigate the putative serotonergic receptors involved in 5-HT-induced contraction in the CE duct, the contraction evoked by 5-HT was evaluated in the presence of increasing concentrations of WAY 100635 (5-HT_{1A} antagonist) and buspirone (5-HT_{1A} partial agonist). Both acted as noncompetitive antagonists (slope less than unity), providing estimated pA_2 values of 8.90 ± 0.04 and 7.34 ± 0.14 , respectively (Fig. 4, B and C; Table 3). At concentrations in which fluoxetine displays affinity at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors (Bonhaus et al., 1997; Ni and Miledi, 1997; Owens et al., 1997; Rothman et al., 2000), 5-HT-induced contractions of the CE duct were right shifted in a surmountable manner with an estimated pA_2 value of 7.44 ± 0.16 (Fig. 4D; Table 3).

***Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, and *Htr2b*, but Not the *Htr2c* Transcript, Are Expressed in the Rat Epididymis.**

Based on the pharmacological data, we performed conventional RT-PCR assays to investigate the expression of *Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2b*, and *Htr2c* transcripts along the rat epididymis (initial segment, caput, corpus, and cauda regions). The detection of these transcripts either in the brain or testis was used as positive controls (Fig. 5). Both the *Htr1a*

and *Htr2b* transcripts were detected in the corpus and CE, while the *Htr2a* transcript appeared in the CE only (Fig. 5). Conversely, the *Htr1b* transcript was found to be ubiquitously expressed throughout the epididymis, with higher abundance in the CE (Fig. 5). The expression of the *Htr2c* transcript was not detected in any region of the epididymis (Fig. 5).

Discussion

We revealed that 5-HT is a contractile agent in the rat CE. The 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors are involved in the 5-HT-mediated contractions of the rat CE smooth muscle, suggesting that this serotonergic transmission might contribute to the coordinated contraction of the CE duct during the transport of spermatozoa within the epididymis. This epididymal event is crucial for the production of a fertile ejaculate since its disruption may affect fertility (Ricker et al., 1997; Solomon et al., 1997; Kempinas et al., 1998). Indeed, the blockade of epididymal and vas deferens contractions during the emission phase of ejaculation has been proposed as a pharmacological strategy for male contraception (Sanbe et al., 2007; White et al., 2013). Our results underscore that the serotonergic system in the epididymis should also be considered when targeting epididymal/vas deferens smooth muscle as a potential target for male contraception.

When used at concentrations within their selectivity windows, some of the most selective SERT inhibitors including paroxetine (0.1–10 nM) and fluoxetine (1–10 nM) were unable to increase the potency of 5-HT in the CE, indicating that the SERT is not involved in the removal of 5-HT. However, paroxetine at concentrations higher than 100 nM caused a 5-fold increase in the potency of 5-HT, which likely results from paroxetine's selectivity loss, and hence NET inhibition

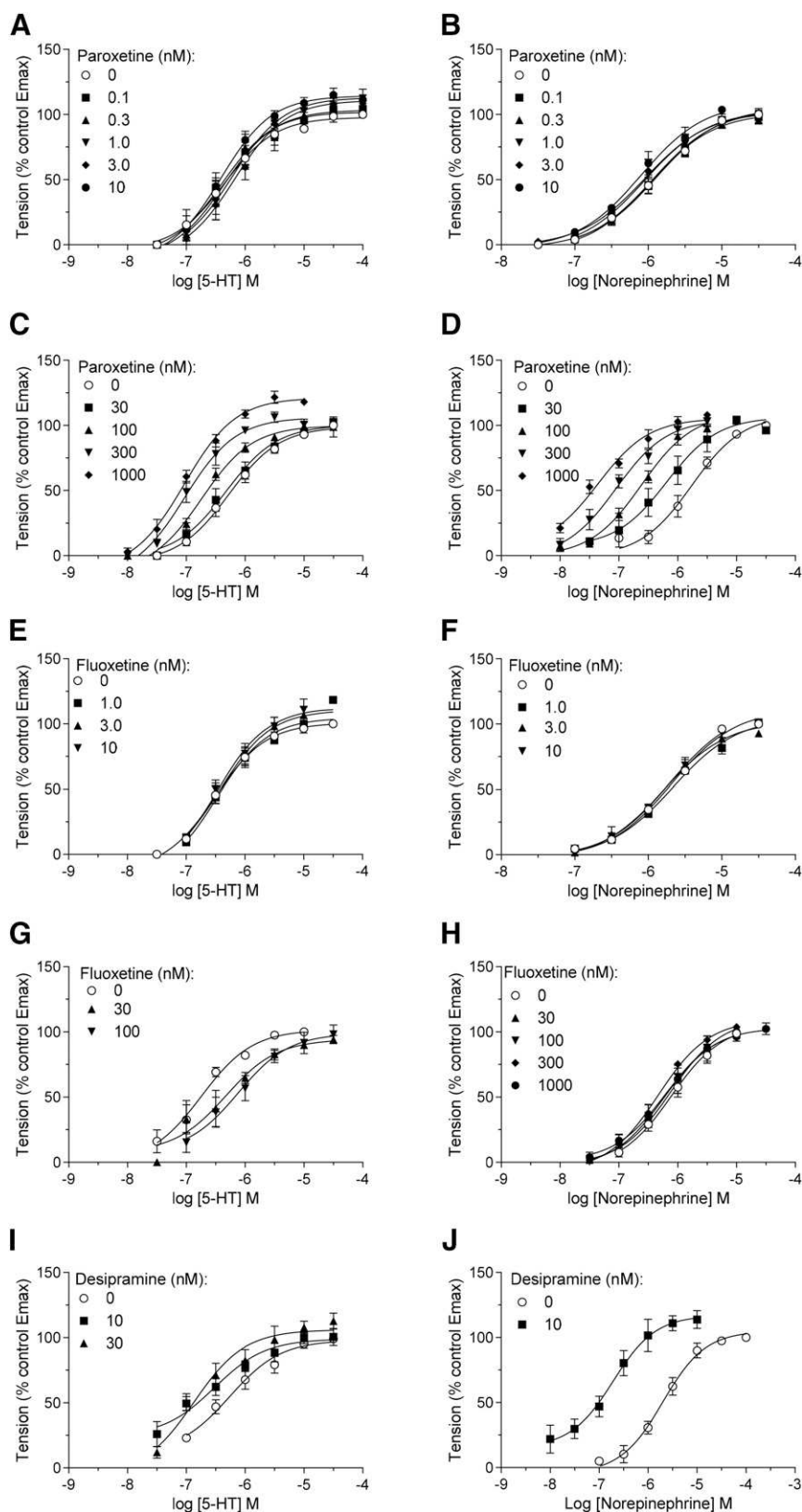


Fig. 2. Differential effects of SERT and NET inhibitors on the 5-HT- and norepinephrine-induced contraction in the rat CE duct. Concentration-response curves to 5-HT are shown on the left and norepinephrine are shown on the right, in the presence of different concentrations of the selective SERT inhibitors paroxetine (A–D) and fluoxetine (E–H) and in the presence of the NET inhibitor desipramine (I and J). Each symbol represents the mean and the vertical bars, when larger than the symbols, represent the S.E.M. of independent experiments performed with CE ducts from four rats.

(Bolden-Watson and Richelson, 1993; Owens et al., 1997; Tatsumi et al., 1997). In fact, at such high concentrations paroxetine also potentiated the effect of norepinephrine, although to a greater extent than for 5-HT; this observation

is supported by the higher affinity of the NET for norepinephrine than for 5-HT (Andersen, 1989; Tatsumi et al., 1997; Rothman et al., 2001). The selective NET inhibitor desipramine also potentiated the effects of both norepinephrine and

TABLE 2

pEC₅₀ values for 5-HT and norepinephrine in the absence and presence of monoamine reuptake inhibitors with the respective concentration ratio. The values of control pEC₅₀ corresponds to the mean of independent experiments carried out in the absence (concentration = 0) of reuptake inhibitor. Data are expressed as mean ± S.E.M. of three to six experiments. The right displacement on the CRC to 5-HT or norepinephrine is denoted by the minus (–) signal before the CR value, which represents the ratio between agonist EC₅₀ in the absence and presence of reuptake inhibitor.

Inhibitor	Concentration <i>nM</i>	5-HT		Norepinephrine	
		pEC ₅₀	CR	pEC ₅₀	CR
Paroxetine	0	6.31 ± 0.11		5.83 ± 0.10	
	0.1	6.39 ± 0.16	1.0	5.94 ± 0.10	1.3
	0.3	6.36 ± 0.17	1.0	5.97 ± 0.10	1.4
	1	6.21 ± 0.16	1.0	6.05 ± 0.13	1.6
	3	6.18 ± 0.14	1.0	6.05 ± 0.11	1.6
	10	6.41 ± 0.06	1.0	6.10 ± 0.11	1.8
	30	6.32 ± 0.13	1.0	6.19 ± 0.25	2.3
	100	6.74 ± 0.08	2.7	6.61 ± 0.10	6.0
	300	7.03 ± 0.11	5.2	7.05 ± 0.11	16.6
	1000	7.03 ± 0.08	5.2	7.35 ± 0.15	33.1
Fluoxetine	0	6.62 ± 0.13		5.90 ± 0.10	
	1	6.48 ± 0.13	–1.3	5.66 ± 0.08	–1.7
	3	6.42 ± 0.18	–1.6	5.80 ± 0.12	–1.2
	10	6.48 ± 0.20	–1.4	5.71 ± 0.08	–1.5
	30	6.33 ± 0.20	–1.9	6.12 ± 0.14	1.6
	100	6.12 ± 0.23	–3.1	6.23 ± 0.07	2.1
	300	ND		6.33 ± 0.10	2.7
	1000	ND		6.21 ± 0.14	2.0
Desipramine	0	6.26 ± 0.15		5.70 ± 0.12	
	10	6.52 ± 0.19	1.8	6.72 ± 0.17	10.5
	30	6.87 ± 0.19	4.1	ND	

ND, Not determined.

5-HT, further supporting the role of the NET in the removal of these two agonists in the CE. Although the presence of the SERT has been reported in epithelial, endothelial, and mast cells of the rat caput epididymis by immunohistochemistry (Jiménez-Trejo et al., 2007), we are not aware of studies describing its presence in epididymal smooth muscle. This may indicate the existence of region- and cell-specific mechanisms for 5-HT removal in the epididymis. It is worthwhile to establish the mechanisms of 5-HT removal in the epididymis in vivo considering both adverse and therapeutic effects of SSRIs on sperm parameters as well as on ejaculatory function (Giuliano and Clément, 2005; Kendirci et al., 2007; Rowland et al., 2010; Tanrikut et al., 2010; Abu El-Hamd and Abdelhamed, 2018).

It is known that 5-HT contracts vascular smooth muscles in vitro through α_1 -AR activation (Innes, 1962; Purdy et al.,

1987; Shaw et al., 2000). Our results showed that part of the 5-HT-mediated contraction of the CE smooth muscle is due to activation of α_1 -ARs. Indeed, the selective α_1 -AR antagonist prazosin, which exhibits low affinity for serotonergic receptors (Norman et al., 1985; Cosseray et al., 1987; Lyon et al., 1987; Pauwels et al., 1993), antagonized 5-HT-induced contraction, yielding an estimated potency of pA₂ = ~8.9 (Table 3) that correlated with the value obtained for prazosin against norepinephrine as well with previous reports of pK_B values at α_1 -ARs (Pupo, 1998; Lima et al., 2005). Moreover, the Schild plot for prazosin against 5-HT yielded a regression line with a slope that was less than theoretical unity, indicating that 5-HT activates other receptor populations in addition to α_1 -ARs.

Considering that the presence of 5-HT G protein-coupled receptors (at least 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2B}) has already been demonstrated in the rat epididymis by histochemical and pharmacological approaches (Leung et al., 1999; Jiménez-Trejo et al., 2007), it is reasonable to hypothesize that the 5-HT metabotropic receptor(s) may be involved in the contractions of the CE smooth muscle to 5-HT. To explore this, the effects of selective 5-HT receptor antagonists on 5-HT-induced contractions were determined in the presence of desipramine to block the removal of 5-HT by the NET and prazosin to antagonize α_1 -ARs.

The potencies found for ketanserin (~9.4) and fluoxetine (7.4) in antagonizing the contractions of the CE to 5-HT are consistent with the participation of 5-HT_{2A}/5-HT_{2C}. This is due to the limited selectivity of ketanserin (Roth et al., 1992; Boess and Martin, 1994; Glennon et al., 2002; Knight et al., 2004) and fluoxetine (Sánchez and Hyttel, 1999; Rothman et al., 2000; Knight et al., 2004) for 5-HT_{2A} over 5-HT_{2C} receptors, and vice versa, thereby showing a weak ability to discriminate between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. However, whereas mRNA encoding 5-HT_{2A} receptors was readily detected in the CE, transcripts for 5-HT_{2C} were not. Thus, it is likely that 5-HT_{2A} receptors have an important role in the contractions induced by 5-HT in the rat CE. It is worth noting that ketanserin presented insurmountable behavior against 5-HT in the CE. This may result from hemi-equilibrium, where the slow dissociation of ketanserin from the receptor within the short time frame required for the contraction leads to reduction in the observed 5-HT maximal response (Kenakin et al., 2006). Interestingly, ketanserin also presented insurmountable antagonism in the contractions induced by 5-HT in the rat uterus, another tissue whose contractions are fast and transient (Ichida et al., 1983).

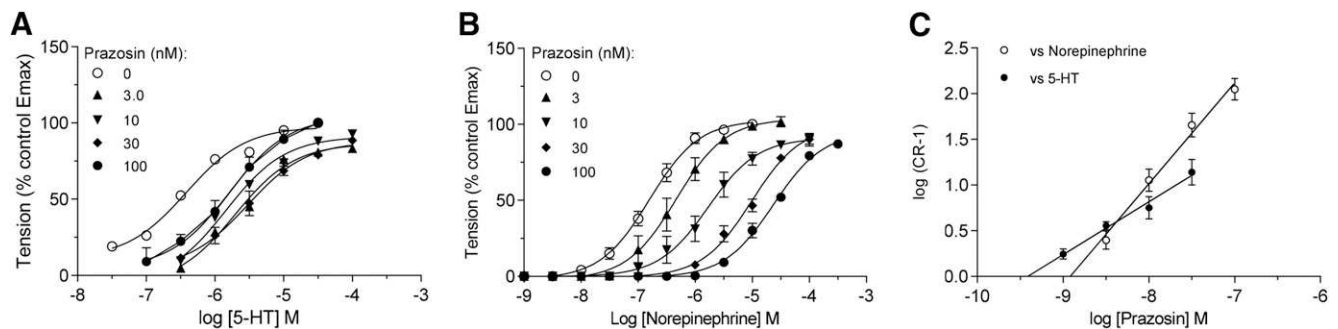


Fig. 3. Effect of prazosin on the 5-HT- and norepinephrine-induced contractions in the rat CE duct. Concentration-response curves for 5-HT (A) and norepinephrine (B). The Schild plot for these antagonisms is presented in (C). Each symbol represents the mean and the vertical line, when greater than the symbol, represents the S.E.M. of independent experiments performed with CE ducts from three to six rats.

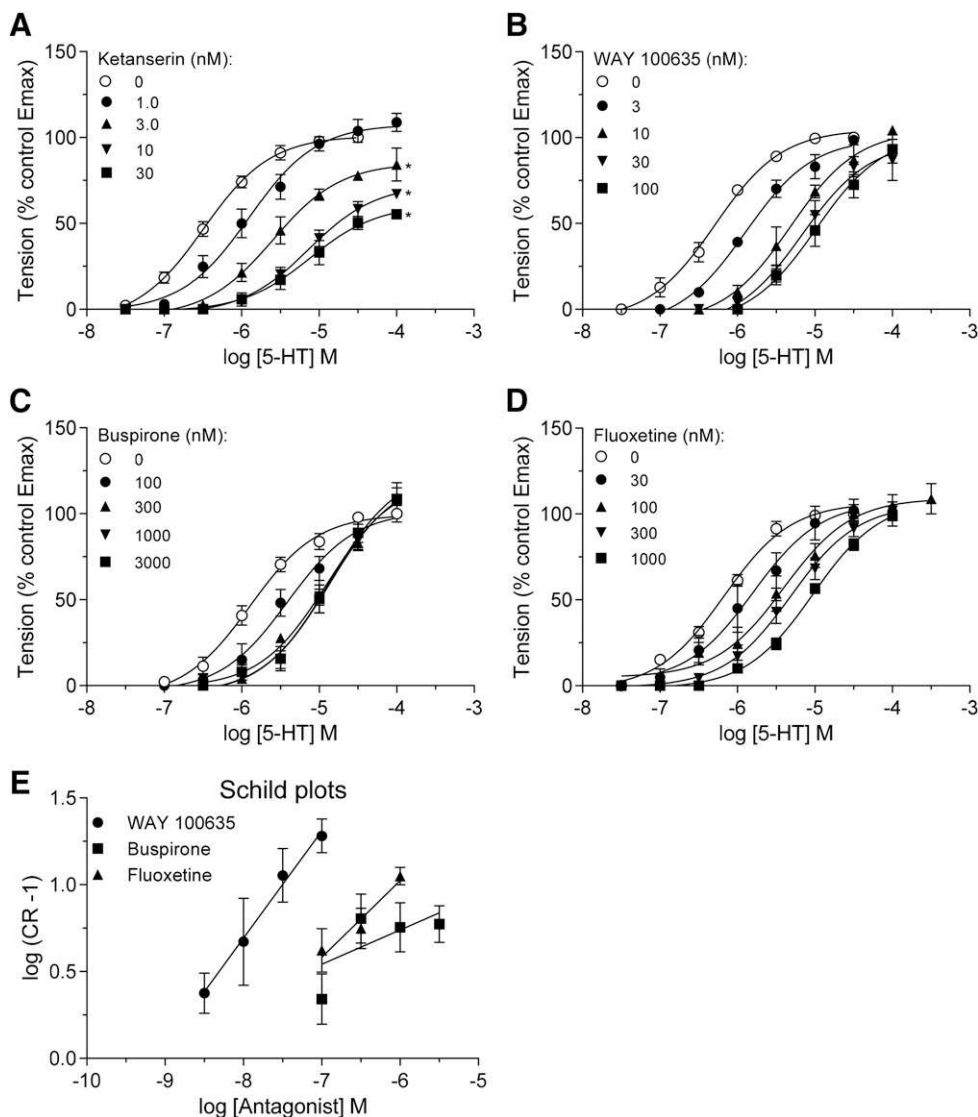


Fig. 4. Effect of 5-HT receptor antagonists on the 5-HT-induced contractions in the rat CE duct. Concentration-response curves to 5-HT in the presence of increasing concentrations of ketanserin (A), WAY 100635 (B), buspirone (C), and fluoxetine (D). All curves were performed in the presence of 100 nM prazosin, which was included in the inhibitor cocktail. The Schild plot for these antagonisms is presented in (E). Each symbol represents the mean and the vertical line, when greater than the symbol, represents the S.E.M. of independent experiments performed with CE ducts from three to four rats. * Denotes the mean depressed maximal response.

In addition to the participation of 5-HT_{2A} receptors, we also found evidence for the involvement of 5-HT_{1A} in the contractions induced by 5-HT in the CE. The contractions induced by 5-HT were antagonized with high potency by the selective 5-HT_{1A} ligands WAY-100635 ($pA_2 = \sim 8.9$) and buspirone ($pA_2 = \sim 7.3$); however, the Schild slopes were much less than unity, further supporting the participation of multiple 5-HT receptors. Indeed, our RT-PCR experiments demonstrated that 5-HT_{1A} and

5-HT_{1B} transcripts are abundantly present in the rat CE. However, additional studies are warranted to investigate the role of 5-HT_{1B} in the contraction of rat CE by 5-HT.

A dense network of interstitial serotonergic fibers has been identified in close proximity to the smooth muscle layer of the distal segment of the CE (Leung et al., 1999). This pattern of innervation is similar to the sympathetic innervation, which is known to play a major role in the contraction of epididymal

TABLE 3

Estimated pA_2 values of selective antagonists against contractile responses elicited by 5-HT in isolated rat CE duct

Mean $\pm$ S.E.M. When the Schild plot slopes were different from unity, the pA_2 values were calculated using the lowest positive values of log (CR - 1); n denotes number of CE preparations.

Antagonist	Agonist	<i>n</i>	pA_2	Schild Slope (95% Confidence Interval)
Prazosin	Norepinephrine	4	8.92 ± 0.06	1.10 ± 0.10 (0.88–1.33)
Prazosin	5-HT	4	8.89 ± 0.20	0.58 ± 0.09 (0.37–0.79)
Ketanserin	5-HT	6	9.36 ± 0.17	— ^a
Fluoxetine	5-HT	6	7.41 ± 0.16	0.44 ± 0.14 (0.13–0.75)
WAY 100635	5-HT	4	8.90 ± 0.04	0.62 ± 0.13 (0.26–0.97)
Buspirone	5-HT	4	7.34 ± 0.14	0.20 ± 0.13 (–0.07 to 0.47)

^aThis could not be examined because the antagonism was insurmountable.

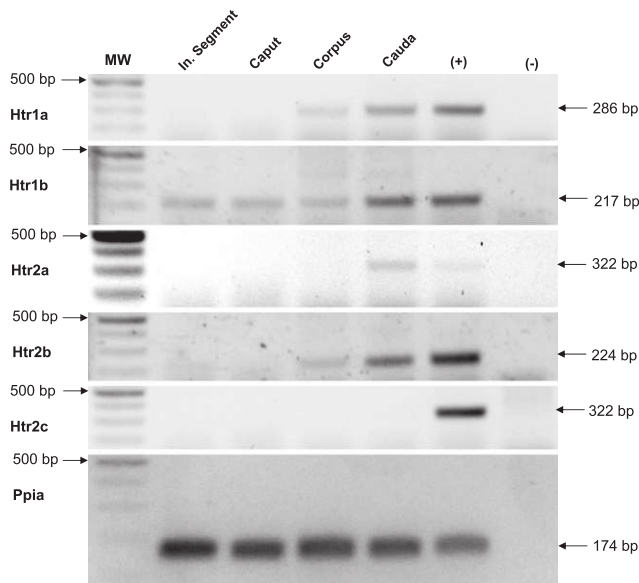


Fig. 5. Expression of 5-HT receptors in the rat epididymis. Representative inverted image of agarose gels showing the detection of *Htr1a*, *1b*, *2a*, *2b*, and *2c* mRNAs by RT-PCR as indicated (right arrow). MW indicates a 100 base pair (bp) standard DNA ladder. *Ppia* mRNA was used as the internal control. Legend: (+) positive control (brain for *Htr1a*, *1b*, *2a*, *2c*, and *Ppia* or testis for *Htr2b*); (–) negative control (H_2O). Results are representative of experiments performed in duplicate with tissues from one rat.

smooth muscle, transport of spermatozoa, and fertility (Kempinas et al., 1998; Ricker, 1998). In agreement with these observations, our results showed that the abundance of all 5-HT receptor transcripts analyzed was higher in the cauda epididymis when compared with proximal regions of this organ. It is recognized that proximal and distal epididymal regions display different morphologic and functional properties (Hinton and Robaire, 2015). Thus, further studies are warranted to understand the roles of 5-HT as a factor regulating the smooth muscle contractions also in the proximal regions of the epididymis.

It has been proposed that 5-HT regulates anion secretion from the CE epithelium via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptors (Leung et al., 1999) and our data provide new insights into the potential roles of 5-HT as a signaling molecule regulating sperm transport and storage in the epididymis. Our study further contributes to the understanding of the peripheral effects of serotonergic drugs in the male reproductive tract.

Authorship Contributions

Participated in research design: Mueller, Kiguti, Silva, Pupo.

Conducted experiments: Mueller, Kiguti.

Contributed new reagents or analytic tools: Silva, Pupo.

Performed data analysis: Mueller, Kiguti, Silva, Pupo.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Mueller, Kiguti, Silva, Pupo.

References

- Abu El-Hamd M and Abdelhamed A (2018) Comparison of the clinical efficacy and safety of the on-demand use of paroxetine, dapoxetine, sildenafil and combined dapoxetine with sildenafil in treatment of patients with premature ejaculation: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Andrologia* **50**:e12829.
- Alexander SP, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, et al.; CGTP Collaborators (2017a) The concise guide to pharmacology 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **174** (Suppl 1):S17–S129.
- Alexander SP, Peters JA, Kelly E, Marrion NV, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, and Davies JA; CGTP Collaborators (2017b) The concise

- guide to pharmacology 2017/18: ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol* **174** (Suppl 1):S130–S159.
- Anderson ME, Paparo AA, and Martan J (1979) Paraformaldehyde-induced fluorescence as a histochemical test for 5-hydroxytryptamine in the epididymis of the opossum. *J Anat* **129**:141–149.
- Andersen PH (1989) The dopamine inhibitor GBR 12909: selectivity and molecular mechanism of action. *Eur J Pharmacol* **166**:493–504.
- Arunlakshana O and Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* **14**:48–58.
- Berger M, Gray JA, and Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* **60**:355–366.
- Boess FG and Martin IL (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* **33**:275–317.
- Bolden-Watson C and Richelson E (1993) Blockade by newly-developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sci* **52**:1023–1029.
- Bonhaus DW, Weinhardt KK, Taylor M, DeSouza A, McNeely PM, Szczepanski K, Fontana DJ, Trinh J, Rocha CL, Dawson MW, et al. (1997) RS-102221: a novel high affinity and selective, 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* **36**: 621–629.
- Campos MG, Oropeza MV, Lemus AE, Garcia GA, Reynoso ME, Campos P, and Ponce-Monter H (1999) The androgenic effect of norethisterone and 5 α -nortestosterone on the contractile response of the rat vas deferens to methoxamine and serotonin. *Life Sci* **64**:PL227–PL233.
- Cossery JM, Gozlan H, Spampinato U, Perdicakis C, Guillaumet G, Pichat L, and Hamon M (1987) The selective labelling of central 5-HT_{1A} receptor binding sites by [³H]5-methoxy-3-(di-n-propylamino)chroman. *Eur J Pharmacol* **140**: 143–155.
- Giuliano F and Clément P (2005) Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control. *Eur Urol* **48**:408–417.
- Glennon RA, Metwally K, Dukat M, Ismaiel AM, De los Angeles J, Herndon J, Teitler M, and Khorana N (2002) Ketanserin and spiperone as templates for novel serotonin 5-HT_{2A} antagonists. *Curr Top Med Chem* **2**:539–558.
- Gonzales GF, Garcia-Hjarles M, and Velasquez G (1992) Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality. *Andrologia* **24**:95–100.
- Hannon J and Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* **195**:198–213.
- Hay DWP and Wadsworth RM (1982) The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. *Br J Pharmacol* **77**:605–613.
- Hinton B and Robaire B (2015) The epididymis, in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Plant T and Zeleznik A, eds) 691–771, Academic Press, San Diego, CA.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Myllecharane EJ, Saxena PR, and Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* **46**:157–203.
- Ichida S, Hayashi T, and Terao M (1983) Selective inhibition by ketanserin and spiperidol of 5-HT-induced myometrial contraction. *Eur J Pharmacol* **96**:155–158.
- Innes IR (1962) An action of 5-hydroxytryptamine on adrenaline receptors. *Br J Pharmacol Chemother* **19**:427–441.
- Jannini EA, Ciocca G, Limoncin E, Mollaioli D, Di Sante S, Gianfrilli D, Lombardo F, and Lenzi A (2015) Premature ejaculation: old story, new insights. *Fertil Steril* **104**: 1061–1073.
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, and Johnston DS (2007) The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biol Reprod* **76**: 561–570.
- Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Queiroz DBC, Padilla P, Avellar MCW, Manzano PR, Manjarrez-Gutiérrez G, and Gutiérrez-Ospina G (2007) Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating state: morphological and biochemical studies. *J Androl* **28**:136–149.
- Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, Narotsky MG, Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD, et al. (1998) Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* **59**:897–904.
- Kenakin T, Jenkinson S, and Watson C (2006) Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:710–723.
- Kendirci M, Salem E, and Hellstrom WJG (2007) Dapoxetine, a novel selective serotonin transport inhibitor for the treatment of premature ejaculation. *Ther Clin Risk Manag* **3**:277–289.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, and Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* **8**:e1000412.
- Kim SW and Paick JS (2004) Peripheral effects of serotonin on the contractile responses of rat seminal vesicles and vasa deferentia. *J Androl* **25**:893–899.
- Kinson GA, MacDonald NE, and Liu CC (1973) The effects of melatonin and serotonin on blood flow fraction and testosterone metabolism in selected organs of the male rat. *Can J Physiol Pharmacol* **51**:313–318.
- Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G, and Bickerdike M (2004) Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **370**:114–123.
- Kormano M and Penttilä A (1968) Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamine in the rat testis and epididymis. *Ann Med Exp Biol Fenn* **46**: 468–473.
- Leung GP, Dun SL, Dun NJ, and Wong PY (1999) Serotonin via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *J Physiol* **519**:657–667.
- Lima V, Mueller A, Kamikihara SY, Raymundi V, Alewood D, Lewis RJ, Chen Z, Minneman KP, and Pupo AS (2005) Differential antagonism by conotoxin ρ -TIA of

- contractions mediated by distinct α_1 -adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *Eur J Pharmacol* **508**:183–192.
- Lyon RA, Davis KH, and Titeler M (1987) 3H-DOB (4-bromo-2,5-dimethoxyphenylisopropylamine) labels a guanyl nucleotide-sensitive state of cortical 5-HT₂ receptors. *Mol Pharmacol* **31**:194–199.
- Ni YG and Miledi R (1997) Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:2036–2040.
- Norman AB, Battaglia G, and Creese I (1985) [3H]WB4101 labels the 5-HT_{1A} serotonin receptor subtype in rat brain. Guanine nucleotide and divalent cation sensitivity. *Mol Pharmacol* **28**:487–494.
- Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, and Nemeroff CB (1997) Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:1305–1322.
- Pacini ESA, Castilho ACS, Hebel-Barbosa F, Pupo AS, and Kiguti LRA (2018) Contraction of rat cauda epididymis smooth muscle to α_1 -adrenoceptor activation is mediated by α_{1A} -adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* **366**:21–28.
- Pauwels PJ, Van Gompel P, and Leysen JE (1993) Activity of serotonin (5-HT) receptor agonists, partial agonists and antagonists at cloned human 5-HT_{1A} receptors that are negatively coupled to adenylate cyclase in permanently transfected HeLa cells. *Biochem Pharmacol* **45**:375–383.
- Pedroso SP, de Souza BP, Jurkiewicz A, Juriewicz NH, and da Silva Junior ED (2017) Effects of in vitro, acute and chronic treatment with fluoxetine on the sympathetic neurotransmission of rat vas deferens. *Auton Neurosci* **203**:17–24.
- Pupo AS (1998) Functional effects of castration on α_1 -adrenoceptors in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* **351**:217–223.
- Purdy RE, Murray DL, and Stupecky GL (1987) Receptors for 5-hydroxytryptamine in rabbit blood vessels: activation of alpha adrenoceptors in rabbit thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **240**:535–541.
- Queiróz DBC, Mendes FR, Porto CS, and Avellar MCW (2002) α_1 -Adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biol Reprod* **66**:508–515.
- Reist M, Pfaffl MW, Morel C, Meylan M, Hirsbrunner G, Blum JW, and Steiner A (2003) Quantitative mRNA analysis of eight bovine 5-HT receptor subtypes in brain, abomasum, and intestine by real-time RT-PCR. *J Recept Signal Transduct Res* **23**:271–287.
- Ricker DD (1998) The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* **19**:1–4.
- Ricker DD, Crone JK, Chamness SL, Klinefelter GR, and Chang TS (1997) Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *J Androl* **18**:131–138.
- Roth BL, Ciaranello RD, and Meltzer HY (1992) Binding of typical and atypical antipsychotic agents to transiently expressed 5-HT_{1C} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **260**:1361–1365.
- Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, and Partilla JS (2001) Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* **39**:32–41.
- Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, and Roth BL (2000) Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* **102**:2836–2841.
- Rowland D, McMahon CG, Abdo C, Chen J, Jannini E, Waldinger MD, and Ahn TY (2010) Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J Sex Med* **7**:1668–1686.
- Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, and Tanoue A (2007) α_1 -Adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol* **152**:332–340.
- Sánchez C and Hyttel J (1999) Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol* **19**:467–489.
- Shaw AM, Brown C, Irvine J, Bunton DC, and MacDonald A (2000) Role of the 5-HT_{2A} receptor and α_1 -adrenoceptor in the contractile response of rat pulmonary artery to 5-HT in the presence and absence of nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther* **13**:277–285.
- Silva EJR, Queiróz DBC, Honda L, and Avellar MCW (2010) Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* **325**:64–77.
- Singh US, Kumar MV, and Panda JN (1987) Changes in angiotensin converting enzyme in testes and epididymis of rat due to serotonin administration. *Andrologia* **19**:153–156.
- Solomon HM, Wier PJ, Ippolito DL, and Toscano TV (1997) Effect of prazosin on sperm transport in male rats. *Reprod Toxicol* **11**:627–631.
- Steidle CP, Cohen ML, Hoover DM, and Neubauer BL (1989) Comparative contractile responses among ventral, dorsal, and lateral lobes of the rat prostate. *Prostate* **15**:53–63.
- Tanrikut C, Feldman AS, Altemus M, Paduch DA, and Schlegel PN (2010) Adverse effect of paroxetine on sperm. *Fertil Steril* **94**:1021–1026.
- Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, and Richelson E (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* **340**:249–258.
- Ventura S and Pennefather JN (1991) Sympathetic co-transmission to the cauda epididymis of the rat: characterization of postjunctional adrenoceptors and purinoceptors. *Br J Pharmacol* **102**:540–544.
- White CW, Choong YT, Short JL, Exintaris B, Malone DT, Allen AM, Evans RJ, and Ventura S (2013) Male contraception via simultaneous knockout of α_{1A} -adrenoceptors and P2X₁-purinoceptors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:20825–20830.

Address correspondence to: Dr. Erick J. R. Silva, Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP - São Paulo State University, Professor Dr. Antonio Celso W. Zanin Street, Rubião Junior District, Botucatu-SP 18618-689, Brazil. E-mail: ejr.silva@unesp.br; or Dr. André S. Pupo, Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP - São Paulo State University, Professor Dr. Antonio Celso W. Zanin Street, Rubião Junior District, Botucatu-SP 18618-689, Brazil. E-mail: aspupo@ibb.unesp.br