

REATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA CAMADA MUSCULAR CIRCULAR INTERNA DO DUCTO DEFERENTE HUMANO

EDUARDO ARY VILLELA MARINHO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de Mestrado (M) candidato a/
Eduardo Ary
Villela Marinho
e aprovada pela Comissão Julgadora

7612197
Albuquerque

Dissertação submetida ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas na área de
Fisiologia e Biofísica

Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito
Co-Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

Campinas - São Paulo, 1997

612719

| | |
|--------------|--|
| UNIDADE | BC |
| N.º CHAMADA: | + UNICAMP |
| | M338r |
| V. | si |
| TÍTULO | 34077 |
| PREÇO | 395/98 |
| | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 11,00 |
| DATA | 30/05/98 |
| N.º CPD | |

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00112423-2

M338r

Marinho, Eduardo Ary Villela

Reatividade farmacológica da camada muscular circular interna do ducto deferente humano. / Eduardo Ary Villela Marinho. -- Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientadores: Alba Regina Monteiro Souza Brito e Regina Célia Spadari-Bratfisch.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Vasos deferentes. 2. Adrenalina - Receptores.
3. Acetilcolina - Receptores. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

EDUARDO ARY VILLELA MARINHO

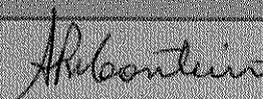
**REATIVIDADE
FARMACOLÓGICA DA CAMADA
MUSCULAR CIRCULAR
INTERNA DO DUCTO
DEFERENTE HUMANO**

Campinas - São Paulo, 1997

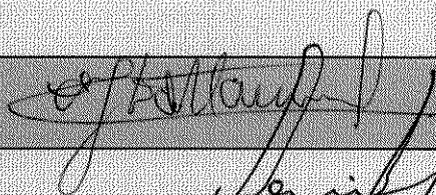
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

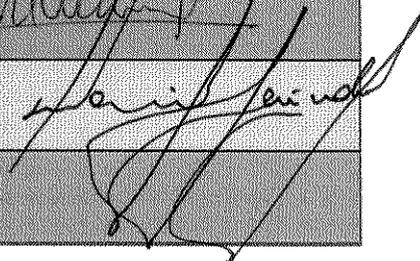
Profa Dra Alba Regina Monteiro Souza Brito

**Membros:**

1.Prof. Dr. Ernesto José Dottaviano



2.Prof. Dr. Daniel Faúndes



3.Profa. Dra. Maria Cristina C. G. Marcondes

Data:

11/12/1997

“Se chegarmos a descobrir uma teoria completa, com o tempo esta deveria ser compreensível para todos e não só para um pequeno grupo de cientistas. Então, todo o mundo poderia discutir sobre a existência do ser humano e do Universo. No caso de encontrarmos a resposta a esta questão, alcançaríamos o triunfo final da razão humana, porque neste momento conheceríamos a mente de Deus. Teríamos tornado realidade todos os nossos sonhos.”

Stephen Hawking

*“Toda vez que uma árvore é cortada aqui na Terra, eu acredito que ela cresça outra vez em outro lugar - em algum outro mundo. Então, quando eu morrer, este é o lugar para onde quero ir.
Onde as florestas vivam em paz.”*

Antonio Carlos Jobim

À

Minha mãe, Juremia, minha companheira,
confidente, conselheira e amiga, pela
confiança depositada, apoio nas horas
difíceis e participação nas horas de alegria
Minha tia, Ana Cândida, pela confiança e
infinito esforço para que este trabalho
pudesse ser realizado,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

São muitos e os fazemos com prazer:

- ao Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP e seus funcionários pela oportunidade de desenvolver este trabalho;
- à Sonia Oliveira pela colaboração e serviços prestados na secretaria do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP;
- aos colegas de laboratório que, de alguma maneira, nos ajudaram na elaboração desta dissertação;
- à Vanderci Aparecida dos Santos pela ajuda prestada no laboratório durante todo o período da elaboração da parte prática deste trabalho;
- ao Dr. Daniel Faúndes e Dr. Antero Marques Perdigão, do CAISM/UNICAMP, pelo fornecimento dos tecidos, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho;
- à Sra. Lara, enfermeira prestativa, que sempre se fez presente nos dias de cirurgia, no CAISM/ UNICAMP;
- aos pacientes do Ambulatório de Planejamento Familiar do CAISM/UNICAMP, que concordaram em ceder o tecido obtido nas cirurgias de vasectomia;
- à Faculdade de Ciências Médicas e CAISM/UNICAMP pela colaboração prestada;
- aos meus amigos João Luiz, Lara Sette, Eder Dutra, Mara Gomes, Fábio Marson e Daniela Marinho pelos bons anos de convivência, horas de lazer e de dificuldades que juntos passamos;
- ao meu irmão Mauri e minhas sobrinhas Gabriele e Thaís, pela força e apoio que sempre me deram;
- aos amigos sinceros com os quais convivemos durante o período de elaboração desta dissertação;

- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza-Brito, orientadora deste trabalho, pelos conhecimentos passados e pelo apoio recebido.

À Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch, co-orientadora deste trabalho, pelos anos de convivência no laboratório, conhecimentos passados, apoio recebido e principalmente pela amizade cultivada, sem a qual esta dissertação não seria possível de ser realizada.

GLOSSÁRIO

CAISM- Centro de Atendimento Integral à Saúde da Mulher.

gf- gramas força.

gf/g de tecido úmido- gramas força por grama de tecido úmido.

CTA- Cortes transversais alternados.

pD₂- logaritmo negativo da dose do agonista que produz uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima.

EC₅₀- dose do agonista que produz uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima.

pA₂- logaritmo negativo da concentração molar do antagonista que desloca a curva dose-efeito do agonista em duas vezes à direita.

DR- anti-logaritmo da diferença dos valores pD₂ na ausência e na presença do antagonista.

K_B- Constante de dissociação do antagonista obtido através da equação:

$$K_B = [B]/\log (DR-1)$$

[B]- concentração molar do antagonista

log [B]- logaritmo da concentração molar do antagonista.

RMax- Resposta máxima.

µg- microgramas.

IP₃- inositol trifosfato.

MAO- Monoaminoxidase.

COMT- Catecol-orto-metil transferase.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------|----|
| I- RESUMO..... | 1 |
| II- SUMMARY..... | 3 |
| III- INTRODUÇÃO..... | 4 |
| IV- OBJETIVOS..... | 12 |
| V- MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| VI- RESULTADOS..... | 23 |
| VII- DISCUSSÃO..... | 43 |
| VIII- CONCLUSÃO..... | 52 |
| IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

I-FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1..... | 18 |
| Modelos das preparações com musculatura circular | |
| FIGURA 2..... | 24 |
| Padrões de respostas obtidos com as diferentes preparações | |
| FIGURA 3..... | 25 |
| Curvas dose-efeito obtidas com as diferentes preparações | |
| FIGURA 4..... | 27 |
| Registro de resposta a agonistas colinérgicos | |
| FIGURA 5..... | 28 |
| Registro de resposta ao isoproterenol | |
| FIGURA 6..... | 30 |
| Curvas dose-efeito à noradrenalina | |
| FIGURA 7..... | 32 |
| Curvas dose-efeito à fenilefrina | |
| FIGURA 8..... | 34 |
| Curvas dose-efeito à noradrenalina e à fenilefrina | |
| FIGURA 9..... | 36 |
| Gráfico de Schild para o antagonismo do prazosin | |
| FIGURA 10..... | 37 |
| Registro de resposta à clonidina | |
| FIGURA 11..... | 38 |
| Registro de resposta à tiramina | |
| FIGURA 12..... | 40 |
| Estudo dos Sistemas de Metabolização de Catecolaminas | |

| | |
|----------------------|----|
| FIGURA 13..... | 42 |
| Efeito da Nifedipina | |

II-TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1..... | 26 |
| Resposta à noradrenalina em três preparações diferentes | |
| TABELA 2..... | 29 |
| Resposta à noradrenalina na ausência e presença de prazosin | |
| TABELA 3..... | 31 |
| Resposta à fenilefrina na ausência e na presença de prazosin | |
| TABELA 4..... | 33 |
| Valores comparativos: Noradrenalina x Fenilefrina | |
| TABELA 5..... | 35 |
| Inclinação das retas do gráfico de Schild e valores pA_2 | |
| TABELA 6..... | 39 |
| Sistemas de Metabolização de Catecolaminas | |
| TABELA 7..... | 41 |
| Resposta à noradrenalina na ausência e na presença de nifedipina | |

RESUMO

Neste trabalho foram investigadas as respostas da camada muscular interna do ducto deferente humano a agonistas colinérgicos e adrenérgicos na ausência e na presença de antagonistas. Os ductos foram obtidos de homens saudáveis com idade entre 25 e 45 anos, em cirurgia de vasectomia, e imediatamente colocados em solução de Krebs-Henseleit, onde foram mantidos sob refrigeração, até o momento da realização do experimento. Os experimentos ocorreram no máximo 48 horas após a cirurgia.

Os ductos foram preparados de três maneiras distintas: tiras em espiral, anéis ou cortes transversais alternados, para definição da preparação mais sensível, a qual seria utilizada nos experimentos subsequentes. Foi definido anteriormente que seria mais sensível aquela preparação que mostrasse maior resposta máxima e maior valor pD_2 para a noradrenalina.

Após a definição da técnica, os ductos foram submetidos à ação de agonistas colinérgicos. Não foram obtidas respostas contráteis a estes agonistas. Em seguida foram realizadas curvas dose-efeito a agonistas adrenérgicos, com os quais foram obtidas respostas que permitiram o estudo da população de adreno-receptores, assim como estudos dos sistemas de metabolização de catecolaminas nesta região do tecido. Para o estudo das populações específicas de receptores, foram utilizados agonistas e antagonistas seletivos.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

a preparação mais sensível e, portanto, a ser utilizada no estudo da contração da camada muscular circular interna do ducto deferente humano, é a preparação em espiral;

a preparação em estudo é insensível a agonistas colinérgicos, sugerindo ausência ou população restrita de receptores na região estudada;

a contração da camada circular é fundamentalmente adrenérgica, verificando-se principalmente a presença de receptores do tipo α_1 ;

os sistemas de metabolização de catecolaminas são ativos, atuando de maneira conjunta (recaptação neuronal e captação extraneuronal);

estudos funcionais permitiram ainda sugerir que parte da resposta pode estar associada a receptores do sub-tipo α_{1a} , os quais utilizam o cálcio extracelular como segundo mensageiro.

SUMMARY

The objective of this work was to investigate the response of the circular smooth muscle layer of the human vas deferens to cholinergic and adrenergic agonists in the absence and in the presence of antagonists. The vas deferens were obtained from 25 to 45 years old men in vasectomy surgeries. Tissues were kept in Krebs-Henseleit solution, under refrigeration, for no longer than 48 hours.

Vas deferens were prepared in three different ways: spiral strips, rings or alternate transversal cuts, in order to determine the most sensitive preparation for the subsequent experiments.

The tissues were exposed to cholinergic agonists but no contractile responses were observed. Tissue exposure to adrenergic agonists resulted in correspondent dose-effect curves, obtained in the absence or in the presence of selective antagonists.

The results indicated that:

the most sensitive preparation was the spiral strip;

the contraction of the circular smooth inner layer is mostly adrenergic with major presence of the α_1 adrenoceptor;

functional studies suggested that a significant part of the response can be associated to α_{1a} adrenoceptors.

INTRODUÇÃO

O ducto deferente é um dos tecidos alvo para o estudo e a caracterização de receptores em toda a história da fisiologia e farmacologia. Isto se deve ao fato deste ducto ser um órgão de fácil acesso e ter uma vasta e variada população de receptores. Além das propriedades citadas, este é um órgão que pode ser retirado sem comprometer a vida do indivíduo, o que é bastante relevante, no caso de humanos.

Os primeiros relatos de estudo do ducto deferente humano remontam ao início do século. MACHT (1917) foi o pioneiro a demonstrar a importância fisiológica do ducto deferente e dos ureteres. A partir de então os estudos envolvendo este órgão prosseguiram e o desafio era demonstrar a sua importância fisiológica (BOEMINGHAUS, 1926), bem como seu papel como órgão de condução. A definição da estrutura do ducto deferente começou a ser elaborada por GOERTTLER em 1934, que postulou um arranjo helicoidal para as fibras musculares que o constituíam. Esta concepção anatômica permaneceu por mais de 30 anos.

O passo mais importante, no entanto, para o esclarecimento do funcionamento do ducto deferente, foi dado em 1940, por MARTINS, que iniciou os estudos farmacológicos no ducto deferente humano, sugerindo um possível controle endócrino da motilidade dos órgãos acessórios genitais masculinos.

Apesar dos trabalhos com ducto deferente terem diminuído nas décadas de 40 e 50, uma nova fase de estudos iniciou-se na década de 60. HUKOVIC (1961) estudou a preparação em órgãos isolados de cobaias e, a partir de então, os estudos em roedores proliferaram.

BENTLEY & SABINE (1963) estudaram o efeito de drogas simpatomiméticas em preparações isoladas de cobaias; NOREBERG et al. (1967) esclareceram o papel da inervação adrenérgica do trato reprodutor de alguns mamíferos, inclusive em roedores; KASUYA & GOTO (1968) estudaram o mecanismo de supersensibilidade induzido pela cocaína em ductos deferentes de ratos, enquanto THOA & MAENGWYN-DAVIES (1968) analisaram o mecanismo de metabolização de catecolaminas em cobaias.

SJOSTRAND (1965) estudou a inervação adrenérgica do ducto deferente e das glândulas acessórias do trato genital masculino humano, enquanto BIRMINGHAM (1968) demonstrou que este tecido isolado respondia igualmente à estimulação elétrica e a alguns fármacos; a análise dos efeitos da desnervação simpática do ducto deferente humano, foi feita por BIRMINGHAM (1970).

Os estudos realizados mostraram um importante componente adrenérgico na resposta contrátil do ducto deferente de roedores e de humanos, assim como diferenças significativas nas respostas obtidas nas duas preparações, sugerindo estudos mais aprofundados em ambos.

PABST & LIPPERT (1970) redefiniram a estrutura do ducto deferente humano proposta por GOERTTLER (1934) mostrando, através de estudos histológicos do tecido, as características que são atualmente aceitas: duas camadas musculares longitudinais, uma externa e outra interna, e uma camada muscular circular, localizada entre as duas camadas longitudinais.

BAUMGARTEN et al. (1971) demonstraram que as três camadas descritas por PABST (1970) no ducto deferente humano seriam inervadas pelo plexo hipogástrico do nervo pré-sacral. Os dois trabalhos foram de grande importância, não só do ponto de vista morfológico,

como também da distribuição da inervação e da definição das propriedades das regiões em que foram divididos os ductos deferentes, ou seja, porções proximal, média e distal em relação ao epidídimo.

Posteriormente, estes trabalhos foram revistos e discutidos por VENTURA et al. (1973) e por BATRA (1974) que confirmaram as hipóteses anteriores e aperfeiçoaram os trabalhos demonstrando a importância da inervação pelas terminações nervosas simpáticas e suas variações nas diferentes porções do ducto. Em roedores também foram verificadas diferenças nas porções quanto à reatividade a agonistas (SOUZA BRITO et al., 1989). Nestes trabalhos foi evidenciada, ainda, uma possível participação da região proximal do ducto deferente, na fase de maturação final dos espermatozóides, além de demonstrar que contrações das várias camadas musculares eram necessárias para o envio dos espermatozóides, desde o epidídimo até o ducto ejaculatório (VENTURA et al., 1973).

Posteriormente, o emprego de microscopia eletrônica, permitiu determinar, com maior precisão, as variações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais deste tecido (HOFFER, 1976; PANIAGUA et al., 1981 e NISTAL et al., 1992). A partir destes estudos observou-se, por exemplo, que a transmissão no ducto deferente humano era fundamentalmente adrenérgica. Restava saber quais seriam os receptores envolvidos e quais eram os componentes modulatórios efetivos da contração.

Concomitantemente, seguiram-se estudos feitos com roedores, nos quais começaram a ser demonstradas características do ducto deferente não observadas em ductos humanos. Dentre outros aspectos, demonstrou-se que a contração do ducto deferente dos roedores não era exclusivamente adrenérgica (AMBACHE & ZAR, 1971;

HEDQVIST & EULER, 1976 e JENKINS et al., 1976). Desse modo, observou-se que os resultados obtidos com roedores não podiam ser extrapolados para os humanos tendo, portanto, que se estudar separadamente os diferentes tecidos.

ANTON & McGRATH (1977) demonstraram que a contração do ducto deferente humano era devida à estimulação adrenérgica e que a mesma podia ser antagonizada por fentolamina ou ioimbina, concluindo que o órgão possuía ambos os receptores, α_1 e α_2 adrenérgicos. Além disso, foram feitos experimentos estudando a participação de cada uma das camadas, longitudinal e circular, no peristaltismo do órgão, necessário ao transporte de espermatozoides desde o epidídimo até o ducto ejaculatório (BATRA, 1974). ANTON & McGRATH (1977) também demonstraram as diferenças de respostas contráteis obtidas com os ductos deferentes humanos e aquelas de ductos deferentes de camundongos, cobaias e coelhos. Tais resultados confirmaram os estudos anteriores de JENKINS et al. (1976) e HEDQVIST & EULER (1976) onde foram propostos diferentes mecanismos de ação envolvidos na contração do ducto deferente de humano e de roedores.

RATNASOORIYA et al. (1979) determinaram que o ducto deferente humano poderia apresentar quatro padrões de respostas diferentes, sendo que um mesmo tecido apresentaria no máximo dois desses padrões. Os quatro padrões descritos foram:

1) uma resposta contrátil, tônica, inicial, acompanhada ou não de contrações fásicas;

2) picos fásicos, acompanhados de pequenas contrações tônicas, repetidas;

3) contrações fásicas, repetidas em grupos de três ou quatro, de intensidade igual ou próxima; e

4) contrações fásicas simples.

A partir dos dados anteriormente descritos passou-se à determinação dos componentes modulatórios, caracterização de outros receptores e participação dos receptores α -adrenérgicos na resposta contrátil do órgão.

Nesse período, o estudo desse órgão atraiu a atenção da comunidade científica, em vista do grande interesse em produzir uma droga que tivesse um resultado contraceptivo satisfatório, sem os efeitos colaterais previsíveis, devido à sua ação sistêmica; além disso, esta droga evitaria as atuais cirurgias de vasectomia, que submetem o indivíduo a uma extirpação, à qual, na maioria das vezes, é irreversível.

Na década de 80 iniciaram-se os estudos com radioligantes (MINNEMAN, 1983) e aqueles de biologia molecular (COTECCHIA et al., 1988). Estes estudos permitiram a descoberta de inúmeras drogas que possibilitaram a caracterização farmacológica dos subtipos de receptores alfa, α_{1a} e α_{1b} (HAN, et al., 1987a e b). Esta descoberta, por sua vez, contribuiu para uma melhor compreensão da fisiologia do ducto deferente.

Além disso, outros receptores foram caracterizados, alguns participando de modo significativo, e outros de menor importância, na contração do órgão, em humanos. Dentre os mais importantes destacam-se os receptores para dopamina (CANEVARI et al., 1986), vasopressina (ANDERSSON et al., 1988) e histamina (LAU et al., 1989), além da hipótese de uma co-transmissão purinérgica (ATP), concomitante à neurotransmissão adrenérgica (ALM, 1982).

Outro aspecto bastante investigado, nos estudos envolvendo o ducto deferente, é a participação e a origem, intra ou extracelular, do cálcio na contração. Este estudo foi iniciado por FOVAEUS et al. (1987) que demonstraram, através da utilização de bloqueadores de canais de cálcio, que somente parte da resposta contrátil seria dependente do cálcio extracelular; a parte restante da resposta seria devida à liberação deste cátion, que se encontra armazenada no retículo sarcoplasmático ou outro estoque intracelular. Neste trabalho foi demonstrado também que, tanto as contrações tônicas, quanto as contrações fásicas eram sensíveis a bloqueadores de cálcio (nifedipina, verapamil e diltiazem).

A seqüência destes resultados foi dada por HAN et al. (1987b); SMITH & BRAY (1990) e AMOBI & SMITH (1990, 1991, 1992, 1993 e 1995) que confirmaram as hipóteses de FOVAEUS et al. (1987), demonstrando a importância relativa do cálcio de origem extra e intra celular nas contrações de ambas as camadas, longitudinal e circular, do ducto deferente humano e de rato.

Deste modo, embora o conhecimento tenha se aprofundado grandemente com todos os dados anteriormente citados, aumentaram também as divergências em relação, principalmente, aos componentes modulatórios da transmissão. Não mais se discutia se a transmissão era adrenérgica, mas sim quais eram os subtipos de receptores envolvidos na modulação da resposta contrátil. Haveria uma participação α_2 adrenérgica pós-sináptica efetiva? Existiria participação da neurotransmissão colinérgica no ducto deferente humano? A participação colinérgica já havia sido demonstrada em roedores por SOUZA BRITO (1985), SOUZA BRITO & JURKIEWICZ (1988) e JURKIEWICZ et al. (1990).

Assim é que, apesar dos inúmeros trabalhos, ainda são desconhecidos quantos são os componentes modulatórios e quais são os receptores efetivamente envolvidos na contração do ducto deferente humano. A participação dos receptores α_1 -adrenérgicos na resposta contrátil do órgão foi bastante investigada (ANTON & McGRATH, 1977; HOLMQUIST et al., 1990; AMOBI & SMITH, 1995; FURUKAWA et al., 1995); entretanto, a definição do subtipo destes receptores ainda precisava ser analisada.

Sabe-se que a participação do subtipo α_{1b} -adrenérgico é pouco significativa na resposta contrátil do ducto deferente humano; porém, não se conseguiu demonstrar ainda qual é a participação dos receptores α_{1c} e α_{1d} (FURUKAWA et al., 1995). Verificou-se também que os receptores α_{1a} devem ter uma participação maior em relação ao número total de receptores adrenérgicos no processo contrátil (HAN et al., 1987 b). Além disso, a nifedipina aboliu somente cerca de 60% da resposta contrátil do ducto deferente humano (FURUKAWA et al., 1995), e a participação de receptores α_{1b} adrenérgicos significativamente ativos foi pequena, enquanto que a participação dos receptores α_{1c} ou α_{1d} -adrenérgicos era praticamente abolida por antagonistas seletivos.

Deste modo, mesmo tendo sido bastante estudado, verifica-se que ainda existem dúvidas quanto à existência do subtipo α_{1c} , pois este possui características muito próximas às do subtipo α_{1a} , parecendo ser uma mutação deste receptor (PEREZ et al., 1994).

Entretanto a população de receptores ainda não havia sido bem determinada nas camadas circular e longitudinal separadamente, restando dúvidas sobre a efetiva participação dos receptores α -

adrenérgicos e colinérgicos no processo contrátil da camada muscular circular do ducto deferente humano.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a preparação mais sensível a ser utilizada para o estudo da participação dos receptores α -adrenérgicos e colinérgicos no processo contrátil da camada circular interna do ducto deferente humano, estudar os sistemas de metabolização de catecolaminas e processos de utilização do cálcio durante o processo contrátil na camada muscular circular.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1- Analisar qual a preparação mais sensível que deverá ser empregada no estudo da camada muscular circular do ducto deferente humano.

2- Determinar se há participação de receptores colinérgicos no processo contrátil da camada muscular circular do ducto deferente humano.

3- Analisar e determinar o papel dos receptores α -adrenérgicos no processo de contração da camada circular.

4- Analisar o processo de metabolismo de catecolaminas na camada muscular circular.

5- Avaliar o modo pelo qual a camada circular do tecido estudado utiliza o cálcio durante o processo contrátil, determinando se as fontes deste cátion, são intra ou extracelulares.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Os Ductos

Foram utilizados ductos deferentes humanos obtidos em cirurgia de vasectomia, realizada em homens saudáveis, com idade variável entre 25 e 50 anos. As cirurgias foram feitas no Ambulatório de Planejamento Familiar do CAISM¹/UNICAMP. Nestas cirurgias foram extraídos segmentos de ductos deferentes de, aproximadamente, 2 cm, os quais foram levados ao laboratório, para a realização dos experimentos. O número total de ductos utilizados neste trabalho foi por volta de cem unidades.

2-Solução Nutritiva

A solução nutritiva utilizada na manutenção da preparação foi Krebs-Henseleit com a seguinte composição química (mM): NaCl, 119; NaHCO₃, 25; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 0,93; MgSO₄, 1,2, glicose, 11,7 e ácido ascórbico (20µM), diluídos em água desionizada.

3- Aspectos éticos

Este estudo não infringiu aspectos éticos visto que nenhum dos homens foi obrigado a participar do estudo cedendo os segmentos de ductos deferentes obtidos nas respectivas cirurgias de vasectomia. Os pacientes que optaram em não participar do estudo não foram prejudicados em nada, referente ao tratamento junto ao ambulatório, ou quanto ao procedimento cirúrgico.

Esta pesquisa respeitou a Declaração de Helsinki II quanto aos direitos dos sujeitos em estudo e manteve sigilo das informações obtidas dos pacientes. Todo paciente que optou pela participação, após a

leitura, entendimento e aprovação, assinou um consentimento informado onde constavam seus dados e informações sobre o estudo que seria realizado com os tecidos doados.

O projeto deste estudo também foi submetido a uma Comissão de Ética Médica do CAISM/UNICAMP, onde foi aprovado segundo o memorando 128/95-SCOB de 14 de setembro de 1995.

4-Isolamento e Preparação dos Órgãos Isolados

4.1-Cirurgia

A cirurgia de vasectomia foi realizada segundo o método descrito por HUBER (1989), a qual consiste do seguinte procedimento: uma anestesia local é feita com xilocaína a 2%, na rafe mediana da bolsa escrotal, e proximal aos dois ductos deferentes; o ducto deferente direito é localizado e levado ao local anestesiado da pele escrotal, onde o mesmo é preso com a pinça de Li; a pele é, então, divulsionada com uma pinça de Kelly afiada, abrindo-se um corte de aproximadamente 1cm, isolando-se o deferente, e tracionando-o até formar uma alça, a qual é seccionada em uma porção de, aproximadamente dois centímetros, na região proximal e mediana do ducto deferente em relação ao epidídimo. Ligam-se os dois cotos com fio catgut 2-0 cromado. O mesmo procedimento é repetido do lado esquerdo quando, então, é feita uma cuidadosa assepsia no local manipulado. Durante todo o procedimento cirúrgico toma-se todo o cuidado com a hemostasia do local divulsionado. Devido à pequena dimensão do corte, não é necessária a realização de sutura. As peças cirúrgicas que, normalmente, após terem sido retiradas seriam desprezadas, foram imediatamente colocadas em frascos de vidro, contendo solução de Krebs-Henseleit.

4.2-Preparação dos Órgãos Isolados

Os órgãos isolados eram preparados assim que chegavam ao laboratório, ou eram mantidos resfriados a 4°C, por até 2 dias após a cirurgia. Este procedimento não causa nenhum prejuízo à resposta (AMOBÍ & SMITH, 1995).

Os ductos foram limpos, retirando-se o excesso de tecido adiposo, e preparados de três maneiras distintas, para definir qual das preparações seria mais adequada para os estudos envolvendo receptores da camada muscular circular interna de ductos deferentes humanos. Foi pré-determinado que a melhor preparação seria aquela que se mostrasse mais sensível a noradrenalina (maior valor pD_2 do agonista, e também que apresentasse a maior resposta máxima). Os três métodos de preparação estão demonstrados na figura 1 e descritos a seguir:

4.2.1 - Preparações em cortes transversais alternados (CTA) - VANE (1957)

Os ductos, depois de limpos, foram seccionados longitudinalmente e, em seguida, cortados transversalmente até seu último terço; o segundo corte foi feito do mesmo modo, porém em sentido contrário, e assim sucessiva e intercaladamente, até o final do tecido (Figura 1B).

Em seguida, uma das extremidades do ducto foi conectada a uma haste acrílica, através de um pequeno gancho; a outra extremidade do ducto foi presa em outro gancho amarrado a uma linha. O conjunto foi colocado em cubas de 10 ml, contendo solução de Krebs-Henseleit, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, aerada com carbogênio (5% CO_2 e 95% O_2). A linha foi conectada a um transdutor isométrico de tensão, enquanto a outra

extremidade da haste foi atada a uma base com regulagem de altura. O transdutor isométrico de tensão foi conectado a um polígrafo/amplificador, para o registro das contrações desenvolvidas pelo órgão. Foi aplicada uma tensão inicial ao tecido, detectada pelo transdutor isométrico de tensão, de 0,5 gramas/força (gf).

4.2.2 - Preparações em espiral - FURCHGOT & BADRAKOM (1953)

Os ductos foram limpos e, em seguida, cortados transversalmente através da luz do ducto, com uma tesoura para cirurgia oftalmológica, num ângulo de 45°, de forma que, ao final do procedimento, obteve-se uma tira em espiral onde se encontrava a musculatura circular intacta, e a musculatura longitudinal seccionada (Figura 1C). Imediatamente após este procedimento, as extremidades do tecido foram presas e preparadas como descrito no item anterior.

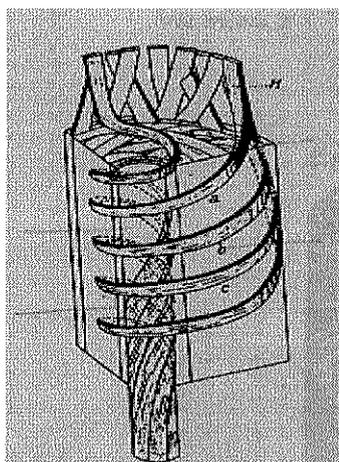
4.2.3 - Preparações em anéis - CASTILLO & DE BEER (1947)

Depois de limpos, os ductos foram preparados através de dois métodos diferentes:

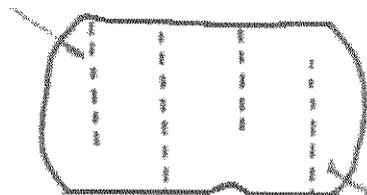
a- Anéis múltiplos: os ductos foram cortados transversalmente de modo a serem obtidos vários anéis; estes foram amarrados uns aos outros através de uma linha passada pela luz dos anéis, formando, desta maneira, um conjunto único, o qual foi preso na haste acrílica por meio de

um último anel feito com a linha (Figura 1D). A outra extremidade foi conectada, também através de um anel de linha, ao gancho. Os procedimentos seguintes são os mesmos que os citados em 3.2.1.

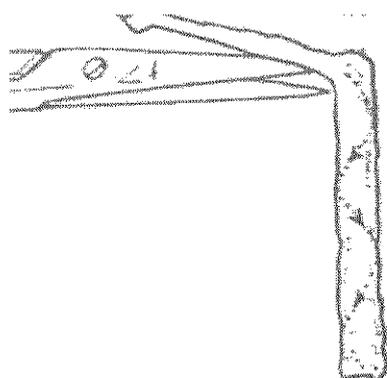
b - Anéis únicos: um único anel foi cortado transversalmente e, através da sua luz, foi passada uma linha, que foi amarrada formando um anel, o qual foi conectado à haste acrílica (Figura 1D). O gancho preso à linha foi passado através da luz do anel, e a preparação levada à cuba para órgãos isolados, seguindo-se os procedimentos descritos em 3.2.1.



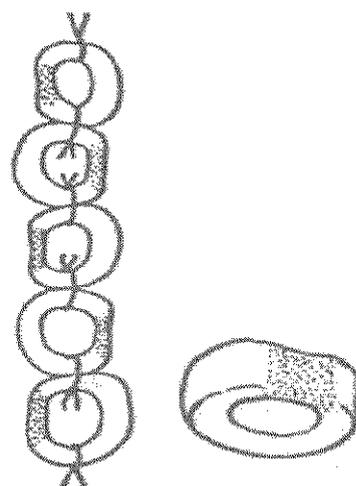
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 1- A- Desenho esquemático das fibras musculares da camada circular do ducto deferente humano (BATRA, 1974). B- Preparação em Cortes Transversais Alternados (CTA) descrita por VANE (1957): as linhas tracejadas indicam os locais onde o tecido foi seccionado. C- Preparação em espiral descrita por FURCHGOT & BADRAKOM (1953), onde foi feito um corte mantendo-se a tesoura com ângulo de 45° em relação ao ducto, obtendo-se desta maneira uma tira como indicado na figura. D- Preparação em anéis descrita por CASTILLO & DE BEER (1947): o ducto é cortado transversalmente de modo a se obterem anéis que são ligados uns aos outros através de linhas ou como anéis únicos como nas figuras.

5 - Curvas Dose-efeito

Os tecidos foram colocados, em cuba para órgão isolado, contendo Krebs-Henseleit, onde permaneceram uma hora, para estabilização. Durante este período, a solução era trocada a cada 15 minutos.

Foram obtidas curvas dose-efeito a agonistas adrenérgicos ou colinérgicos, pelo método de doses isoladas. As curvas foram iniciadas utilizando-se uma dose do agonista suficientemente baixa de modo a não se obter efeito mensurável. As doses crescentes de agonista foram adicionadas ao líquido de incubação, permanecendo em contato com o tecido durante 10 minutos (noradrenalina, clonidina, tiramina, carbacol e acetilcolina) ou 8,3 minutos (fenilefrina). Essa diferença deveu-se à observação de que, quando esse tempo era excedido, o tecido perdia a sensibilidade a este último agonista. Além disto, estes tempos foram determinados como suficientes para a droga se ligar aos receptores e desencadear a resposta. Após este tempo, o polígrafo era desligado e o tecido lavado quatro vezes para a eliminação total do agonista. O intervalo entre as doses foi sempre de 30 minutos. As doses utilizadas foram: noradrenalina (10^{-7} a 10^{-2} M), fenilefrina (10^{-8} a 10^{-2} M), clonidina (10^{-8} a 10^{-3} M), isoproterenol (10^{-8} a 10^{-3} M), tiramina (10^{-4} M), acetilcolina (10^{-8} a 10^{-3} M) e carbacol (10^{-7} a 10^{-3} M).

Cada dose de agonista produziu uma curva cuja área foi calculada. Ao final do experimento, o tecido foi pesado e os dados expressos em gf/g de peso úmido de tecido.

5.1.-Estudos de Metabolização de Catecolaminas

Sabe-se que o ducto deferente de roedores apresenta ambas, recaptção neuronal e extraneuronal ativas (SOUZA

BRITO & JURKIEWICZ, 1988). Para estudar o efeito do bloqueio do mecanismo de recaptação neuronal em ductos deferentes humanos, a preparação foi exposta à ação da desipramina, na concentração de 10^{-6} M, durante trinta minutos, antes da adição do agonista (AXELROD, 1966; KOPIN, 1972)

Para o estudo da captação extraneuronal, foi adicionada ao banho, a corticosterona, na concentração de $10\mu\text{g/ml}$, trinta minutos antes da adição de cada dose de agonista (IVERSEN & SALT, 1970; BONISCH & TRENDELENBURG, 1974)

Foram utilizados os dois fármacos concomitantemente, nas mesmas concentrações citadas anteriormente, também adicionadas trinta minutos antes de cada dose do agonista

5.2- Resposta à Tiramina

A tiramina foi adicionada em uma concentração de 10^{-4} M, concentração na qual foi obtida resposta máxima por RATNASOORIYA et al. (1979). Durante os quarenta minutos seguintes, o polígrafo permaneceu ligado, para registro de qualquer resposta proveniente da ação da tiramina.

5.3- Estudos com antagonistas competitivos adrenérgicos

Foram obtidas curvas dose-efeito a agonistas de adrenoceptores na ausência e na presença de antagonista competitivo. O antagonista foi adicionado ao banho após o período de estabilização e deixado em contato com o tecido durante trinta minutos antes da adição de cada uma das doses do agonista. O antagonista utilizado foi o prazosin (3×10^{-8} , 1×10^{-7} e 3×10^{-7} M).

5.4- Efeito da nifedipina

Após a obtenção da curva dose-efeito à noradrenalina, a preparação foi incubada com um bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependentes, nifedipina (10^{-6}M), adicionado trinta minutos antes do agonista.

6 - Parâmetros Calculados

Em todos os experimentos realizados, após a obtenção dos valores da área sob a curva, foram calculados os seguintes parâmetros farmacológicos:

6.1- Potência dos agonistas

A expressão da potência de agonistas é o valor pD_2 que corresponde ao logaritmo negativo da dose do agonista que produz 50% da resposta máxima, segundo a equação:

$$\text{pD}_2 = \log \frac{1}{\text{EC}_{50}} = - \log \text{EC}_{50}$$

6.2- Resposta Máxima

A resposta máxima foi obtida quando doses maiores do agonista não causaram aumento da resposta contrátil.

6.3- Afinidade dos antagonistas

Essa medida expressa a afinidade de um antagonista competitivo pela população de receptores presentes no tecido. Por definição pA_2 é o logaritmo negativo da concentração molar do antagonista, que desloca a curva dose-resposta do agonista em duas vezes

à direita (SCHILD, 1947; ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959), segundo a equação:

$$\log (DR-1) = \log[B] - \log K_B$$

onde:

DR é o anti-logarítimo da diferença dos valores pD_2 do agonista na ausência e na presença do antagonista (razão ou r).

$\log [B]$ é a concentração de antagonista.

$-\log K_B$ corresponde à afinidade do antagonista pela população de receptores e é fornecida pela interseção com o eixo das abcissas, da reta de regressão obtida plotando-se $\log (DR-1)$ sobre $-\log [B]$, se a inclinação desta reta não diferir estatisticamente da unidade.

6.4 - Análise estatística

Os resultados foram avaliados pelo teste “t” de Student, quando apenas dois grupos de dados foram comparados. A análise monofatorial de variância, seguida de teste de Tukey, foi empregada para comparar mais de dois grupos. As retas obtidas nas regressões lineares foram estatisticamente analisadas pelo método dos quadrados mínimos (BESSE & FURCHGOT, 1976). Foram consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

As Figuras 2 e 3 mostram as curvas dose-efeito à noradrenalina, obtidas em ductos deferentes humanos isolados. Esses tecidos não receberam nenhum tratamento prévio à realização das curvas. Foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as respostas máximas das três preparações (ANOVA, $F_{(2,20)}=11,06$; $p<0,01$). O teste “a posteriori” de Tukey mostra que as respostas máximas de espiral e cortes transversais alternados (CTA) foram iguais entre si, mas ambas foram maiores que aquela obtida na preparação em anéis (Tukey, $p<0,01$). Em relação aos valores pD_2 , verificou-se que havia diferença estatisticamente significativa entre as preparações (ANOVA, $F_{(2,20)}=17,42$; $p<0,01$) em espiral e as preparações em CTA e em anéis (Tukey, $p<0,001$). Como havia sido preestabelecido que a preparação escolhida seria aquela que apresentasse maior sensibilidade, a preparação em espiral foi selecionada para os demais experimentos.

A Tabela 1 mostra os dados ilustrados na Figura 3, onde pode-se observar que a curva da preparação em espiral está deslocada cerca de 3,5 vezes à esquerda da curva obtida com a preparação em CTA.

Depois de definida a técnica a ser utilizada, foram estudadas as respostas a agonistas e antagonistas colinérgicos e adrenérgicos, conforme demonstrado a seguir.

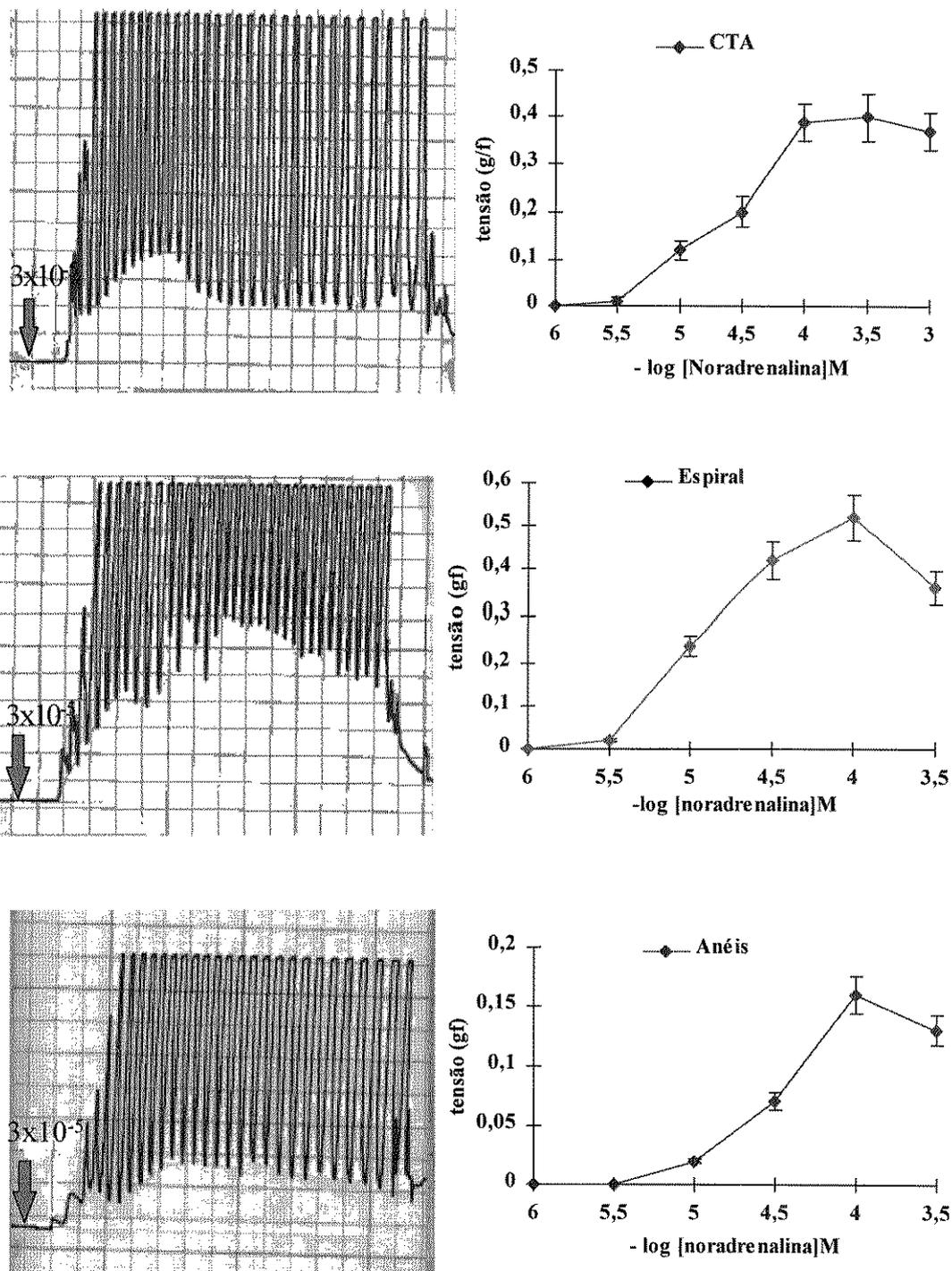


Figura 2- Padrões de respostas obtidas à noradrenalina nas diferentes preparações, acompanhadas das respectivas curvas dose-efeito. CTA corresponde à preparação de cortes transversais alternados. As barras verticais nos gráficos correspondem ao erro padrão da média de, no mínimo, cinco experimentos.

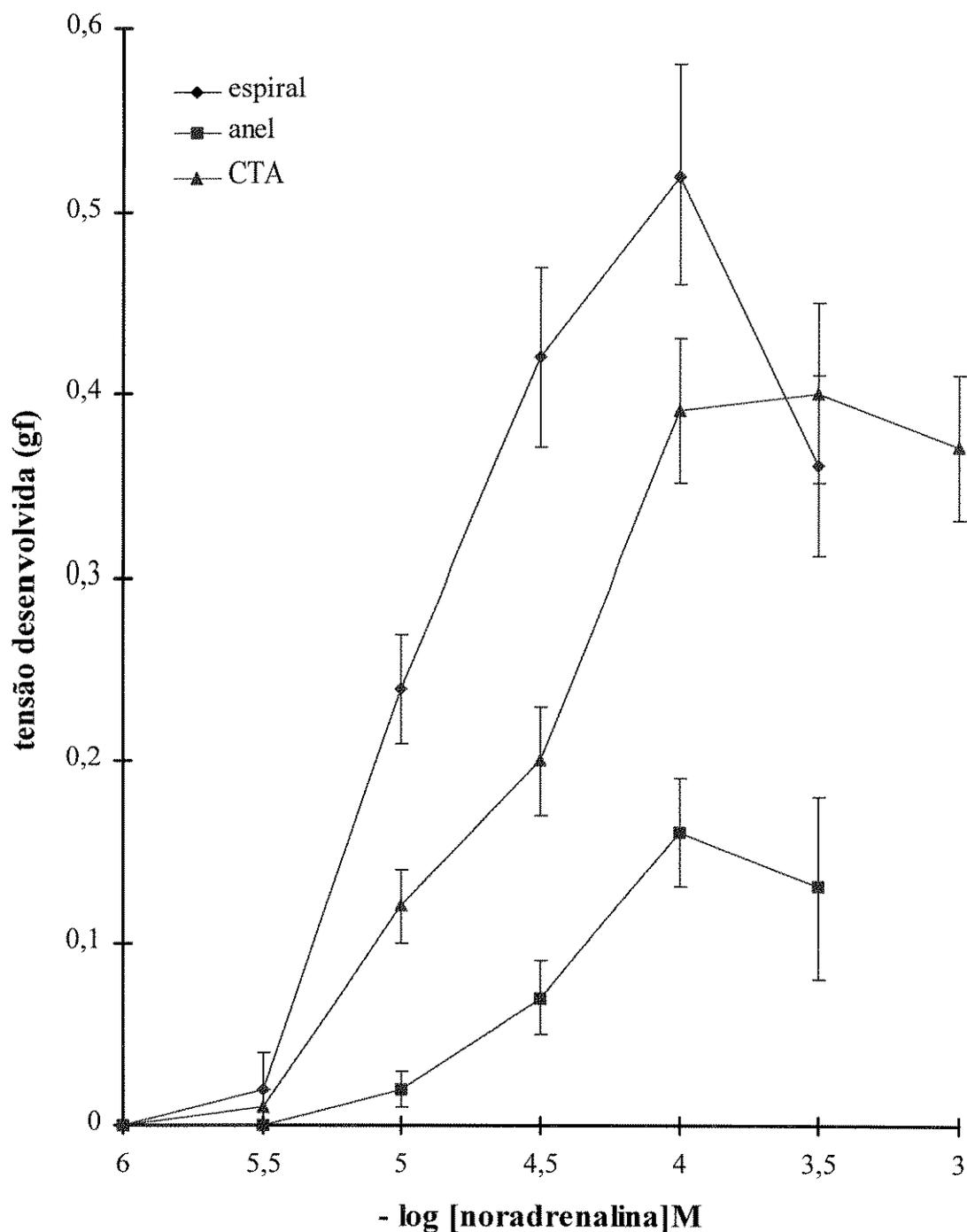


Figura 3- Curvas dose-efeito à noradrenalina obtidas em preparações na forma de espiral, anel ou cortes transversais alternados (CTA). As barras verticais indicam o erro padrão da média de, pelo menos, cinco experimentos.

Tabela 1- Valores pD_2 e resposta máxima à noradrenalina em três preparações de ductos deferentes humanos.

| <i>Tipo de preparação</i> | pD_2^a | $RMax^b$ (gf) | n^c |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| Anéis | 4,47±0,09 ^D | 0,19±0,05 ^A | 5 |
| CTA ^d | 4,40±0,07 ^D | 0,46±0,04 ^B | 8 |
| Espiral | 4,87±0,05 ^C | 0,54±0,05 ^B | 10 |

ANOVA de Rmax $F_{(2,20)}=11,06$ $p<0,01$

ANOVA de pD_2 $F_{(2,20)}=19,94$ $p<0,01$

A,B,C,D- letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa; teste de Tukey, $p<0,01$

a- valor médio dos logaritmos negativos das doses do agonista que produzem uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima (EC_{50}) ± erro padrão da média

b- Valores médios das respostas máximas obtidas, expressas em grama força ± erro padrão da média

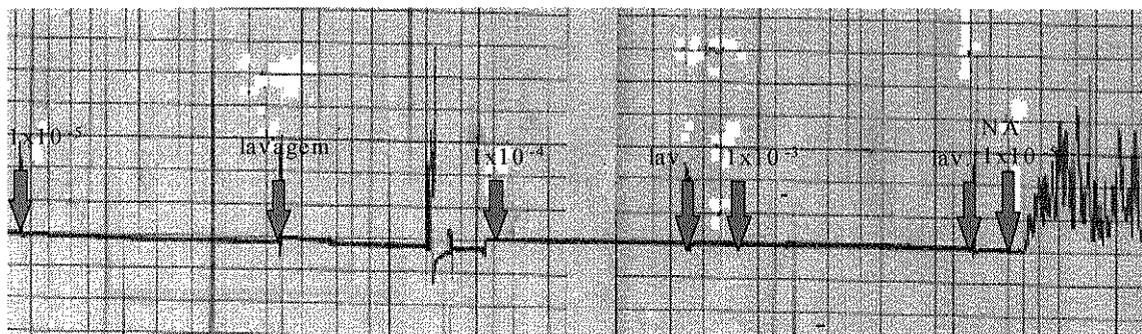
c- número de experimentos

d- Cortes Transversais Alternados

Curvas dose-efeito a agonistas colinérgicos

Os ductos foram preparados e, após o período de estabilização, foram adicionados os agonistas colinérgicos acetilcolina ou carbacol em concentrações crescentes (10^{-8} à 10^{-3} M). As preparações não apresentaram qualquer resposta contrátil à acetilcolina ou ao carbacol, sugerindo ausência ou uma população extremamente restrita destes receptores. Após o término das curvas dose-efeito aos agonistas colinérgicos, os tecidos foram submetidos a uma dose de agonista α -adrenérgico para comprovação da responsividade do tecido (Figura 4).

(A)



(B)

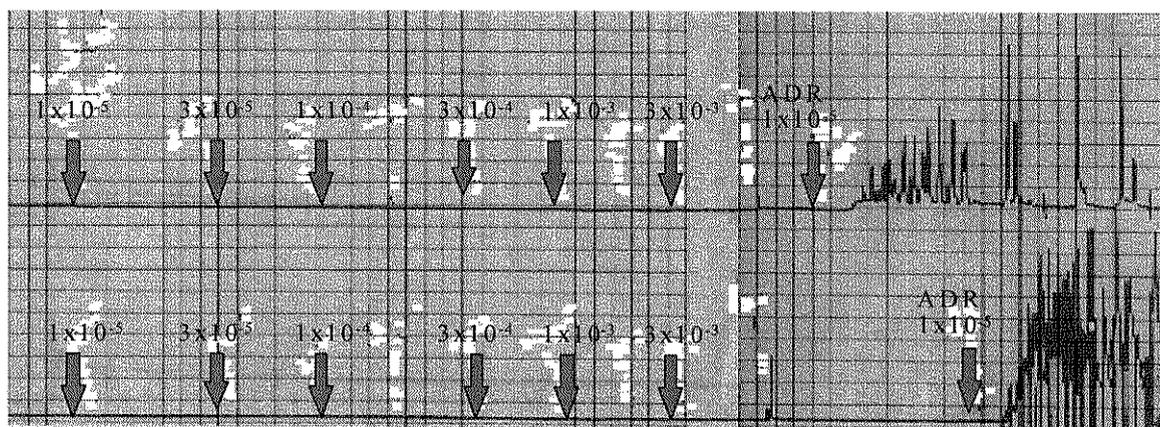


Figura 4- Registro de resposta à acetilcolina (A) e ao carbacol (B). Na curva à acetilcolina estão demonstradas as doses de 10^{-5} à 10^{-3} M, seguidas de uma dose de noradrenalina (10^{-5} M). Na curva ao carbacol as doses são de 10^{-5} à 10^{-3} M, seguidas de uma dose de adrenalina (10^{-5} M).

Curvas dose-efeito a agonistas de adrenoceptores

Foram realizadas curvas dose-efeito ao isoproterenol, agonista de adrenoceptores do tipo β , com os quais não foram obtidos resultados contráteis mensuráveis conforme a Figura 5. Após terem sido realizadas as curvas dose-efeito ao isoproterenol, foram administradas doses de noradrenalina para confirmação da responsividade do tecido (Figura 5)

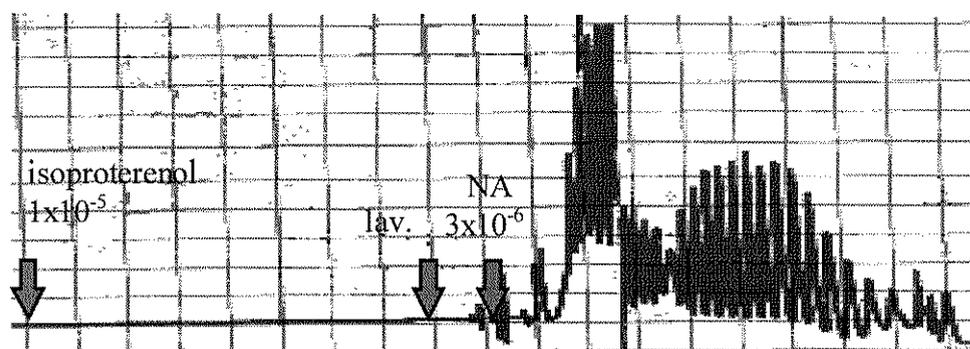


Figura 5- Registro de curva dose-efeito ao isoproterenol, representada pela dose de $1 \times 10^{-5} \text{M}$, seguida de uma dose de noradrenalina ($3 \times 10^{-6} \text{M}$).

A Figura 6 mostra as curvas dose-efeito à noradrenalina, na ausência (controle) e na presença de três doses distintas de prazosin, $3 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$ e $3 \times 10^{-7} \text{M}$. A presença do antagonista determinou deslocamentos significativos da curva à direita (ANOVA, $F_{(2,17)} = 53,91$; $p < 0,001$). Os deslocamentos obtidos após a adição do prazosin (Tabela 2), indicando a presença de receptores α_1 -adrenérgicos foram dose-dependentes.

Tabela 2- Valores pD_2 e resposta máxima à noradrenalina obtidas na ausência e na presença de prazosin.

| <i>Dose de antagonista</i> | pD_2^a | $RMax^b$ (gf/g de tec.) | <i>Razão</i> ^c (vezes) | n^d |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------|
| controle | 4,4±0,4 ^A | 9,3±1,9 | - | 7 |
| 3x10 ⁻⁸ | 4,8±0,7 ^B | 12,4±2,1 | 4,7 | 5 |
| 1x10 ⁻⁷ | 4,6±0,2 ^B | 13,2±3,3 | 7,8 | 5 |
| 3x10 ⁻⁷ | 3,4±0,6 ^C | 17,5±4,3 | 15,5 | 4 |

ANOVA $F_{(3,17)}=53,91$ $p<0,001$

A, B, C- letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa; teste de Tukey, $p<0,05$

a- valor médio dos logaritmos negativos das doses do agonista que produzem uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima ± erro padrão da média

b- Resposta máxima em gf/g de tecido ± erro padrão da média

c- anti-logaritmo da diferença dos valores pD_2 na ausência e na presença do antagonista

d- número de experimentos

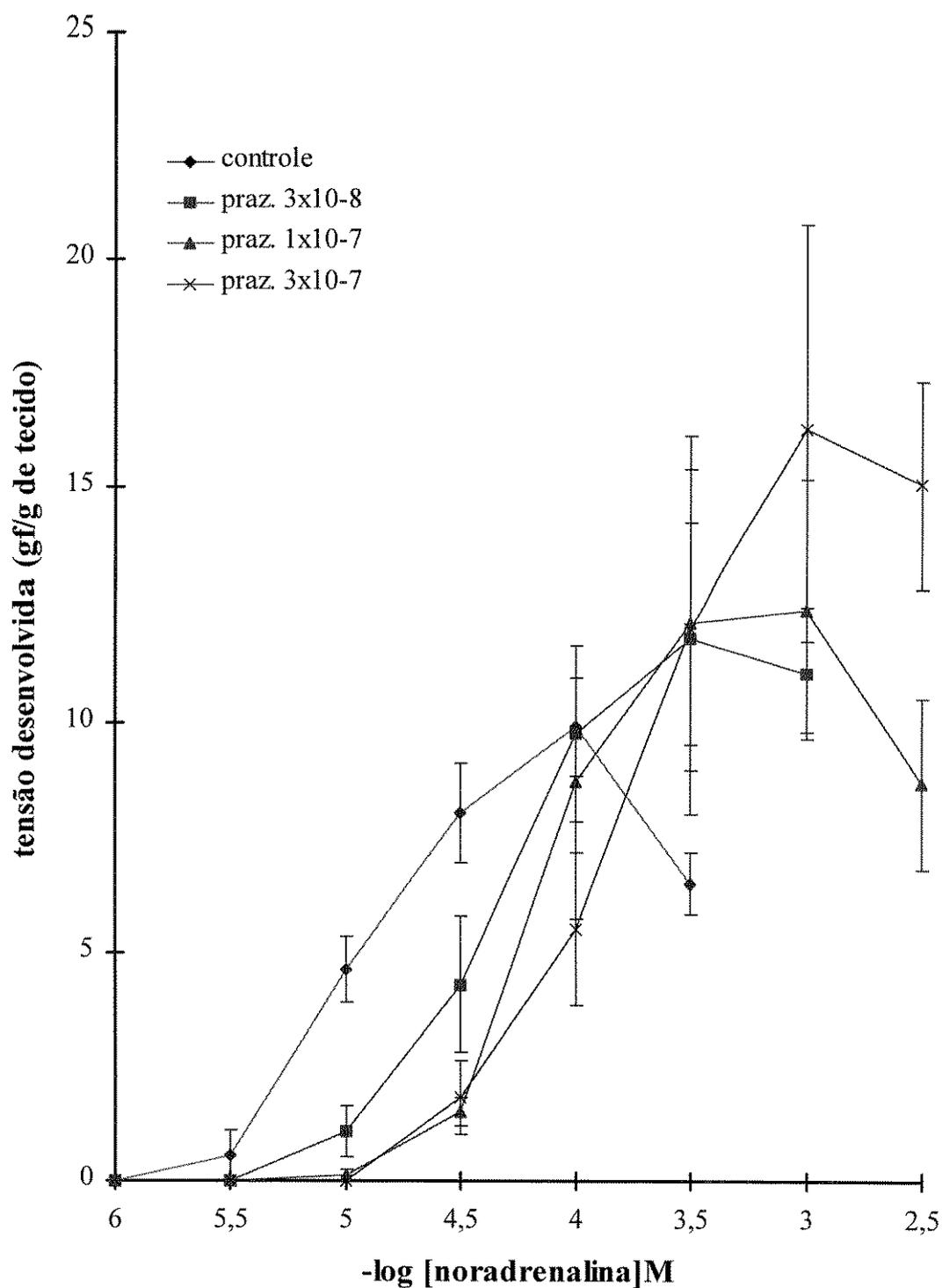


Figura 6- Curva dose-efeito à noradrenalina antes e após incubação com três doses distintas de prazosin. Os dados estão expressos em gf/g de tecido. As barras verticais indicam o erro padrão da média de pelo menos quatro experimentos.

Procedimento semelhante foi empregado para a fenilefrina, um agonista seletivo α_1 -adrenérgico (Figura 7). Essas curvas mostraram deslocamentos significativos à direita na presença do antagonista (ANOVA, $F_{(3,11)} = 40,73$; $p < 0,001$), confirmando uma provável população de receptores α_1 -adrenérgicos, responsável pela contração da camada muscular circular interna do ducto deferente humano. Os dados encontram-se quantificados na Tabela 3.

Tabela 3- Valores pD_2 e Resposta máxima à fenilefrina obtidas na ausência e na presença de prazosin.

| <i>Dose de antagonista</i> | pD_2^a | $RMax^b$ (gf/g de tec.) | <i>Razão</i> ^c (vezes) | n^d |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------|
| controle | 4,89±0,15 ^A | 18,24±2,30 | - | 5 |
| 3x10 ⁻⁸ | 3,69±0,20 ^B | 16,55±5,52 | 15,85 | 3 |
| 1x10 ⁻⁷ | 3,45±0,03 ^B | 15,83±3,85 | 27,54 | 3 |
| 3x10 ⁻⁷ | 3,17±0,06 ^B | 18,70±6,38 | 52,48 | 4 |

ANOVA $F_{(3,11)} = 40,73$ $p < 0,001$; Tukey^{A,B} $p < 0,001$

A, B- letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas; teste de Tukey, $p < 0,001$

a- valor médio dos logaritmos negativos das doses de agonista que produzem uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima ± erro padrão da média

b- valores médios das respostas máxima obtidas, expressas em gf/g de tecido úmido ± erro padrão da média

c- anti-logaritmo da diferença dos valores pD_2 na ausência e na presença do antagonista

d- número de experimentos

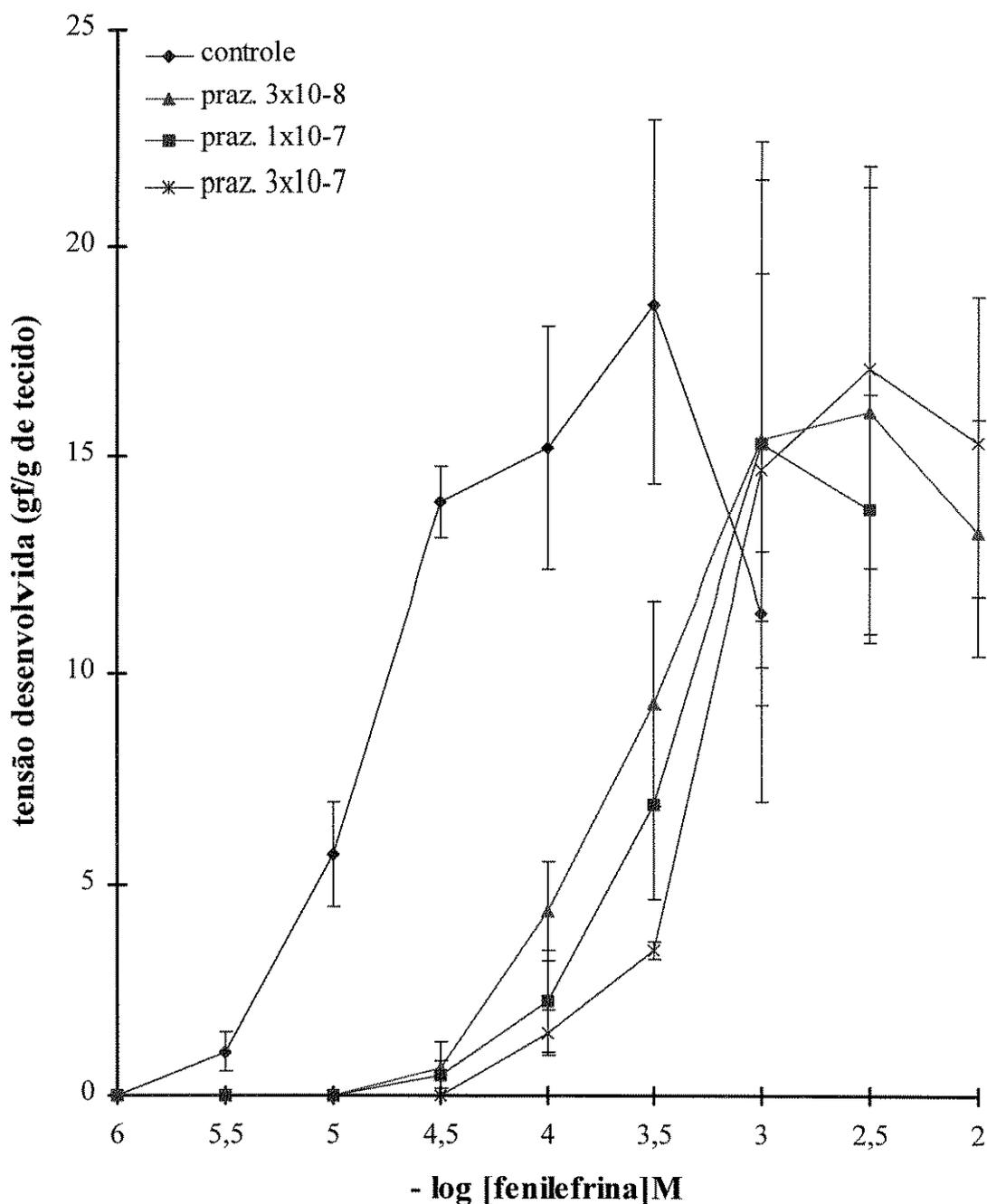


Figura 7- Curvas dose-efeito à fenilefrina na ausência e na presença de três doses distintas de prazosin. Os dados estão apresentados em gf/g de tecido. As barras verticais representam o erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos.

Na Tabela 4 estão demonstrados os valores comparativos, e na Figura 8 estão ilustradas as curvas dose-efeito à noradrenalina e à fenilefrina em gf/g de tecido, para destacar as diferentes respostas máximas obtidas com os dois agonistas de adrenoceptores. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa (teste “t” de Student, $p < 0,05$).

Tabela 4- Valores pD_2 e Resposta máxima à noradrenalina ou à fenilefrina.

| <i>Agonista utilizado</i> | pD_2^a | $RMax^b$ (gf/g de tec.) | n^c |
|-------------------------------|-----------|----------------------------|-------|
| noradrenalina | 4,94±0,04 | 9,93±1,09 | 7 |
| fenilefrina | 4,89±0,15 | 18,24±2,3* | 5 |

*- teste “t” de Student, $p < 0,05$

a- valor médio dos logaritmos negativos das doses do agonista que produzem uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima ± erro padrão da média

b- valor médio das respostas máximas obtidas, expressas em gf/g de tecido úmido ± erro padrão da média

c- número de experimentos

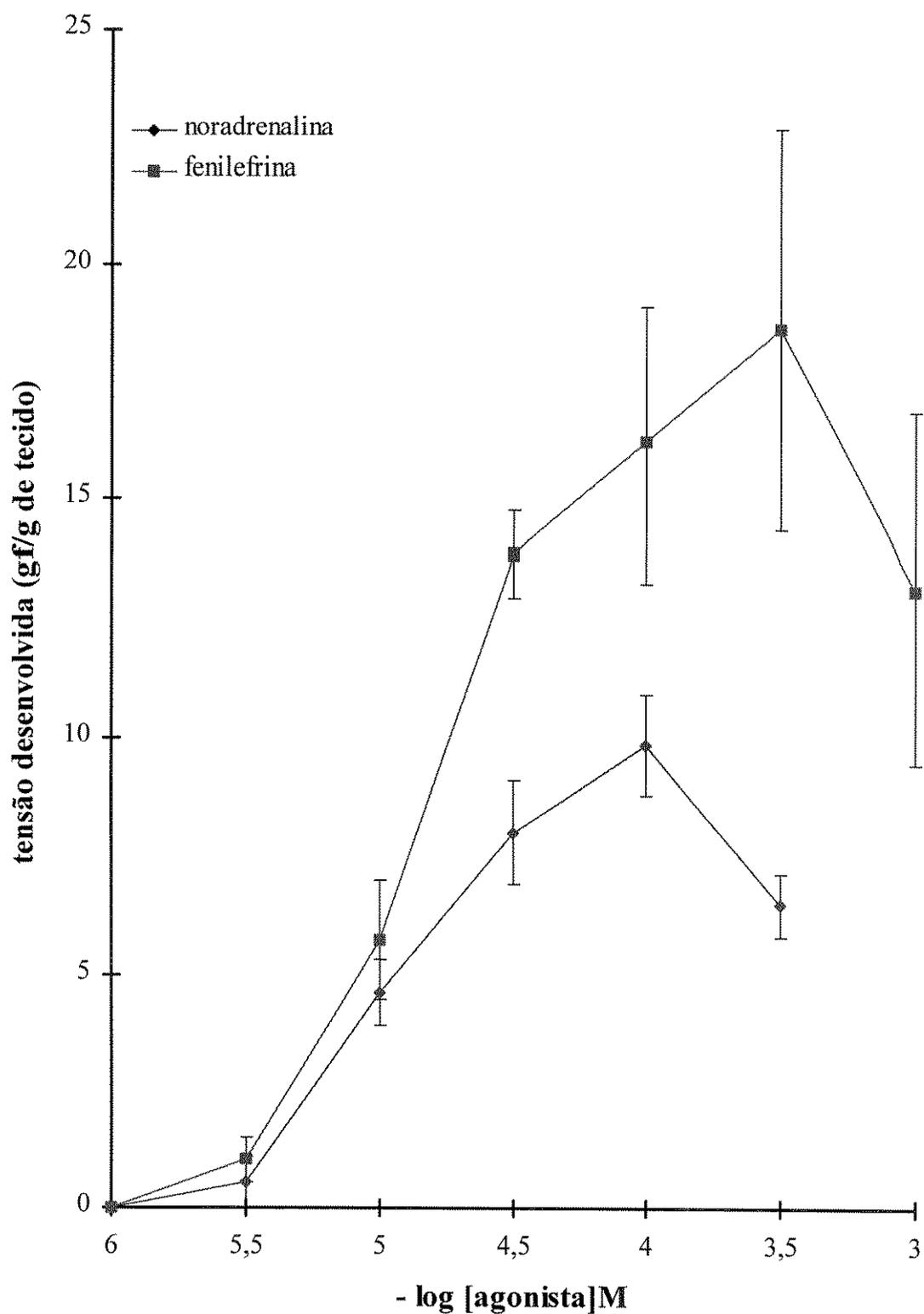


Figura 8- Curvas dose-efeito à noradrenalina e à fenilefrina, representados em gf/g de tecido. As barras verticais representam o erro padrão da média de pelo menos três experimentos.

Para a confirmação da homogeneidade da população de receptores participantes na contração da camada circular do órgão, frente a dois agonistas, fenilefrina e noradrenalina, foram calculados ainda os valores pA_2 do prazosin. Na Figura 9 estão demonstradas as retas de regressão de Schild a partir das quais foram extraídos os valores pA_2 apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Valores de inclinação das retas de regressão e pA_2 do prazosin, usando como agonistas a noradrenalina ou a fenilefrina.

| <i>Agonista</i> | <i>inclinação da reta^a</i> | <i>pA_2^b</i> | <i>n^c</i> |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| noradrenalina | 0,85 (0,55 - 1,15) | 8,16±0,10 | 15 |
| fenilefrina | 0,94 (0,55 - 1,33) | 8,24±0,09 | 9 |

a- inclinação da reta de regressão do gráfico de Schild, acompanhada dos respectivos limites de confiança para cada agonista

b- logaritmo negativo da concentração molar do antagonista que desloca a curva dose-efeito do agonista em duas vezes à direita, expresso em média ± erro padrão da média

c- número de experimentos

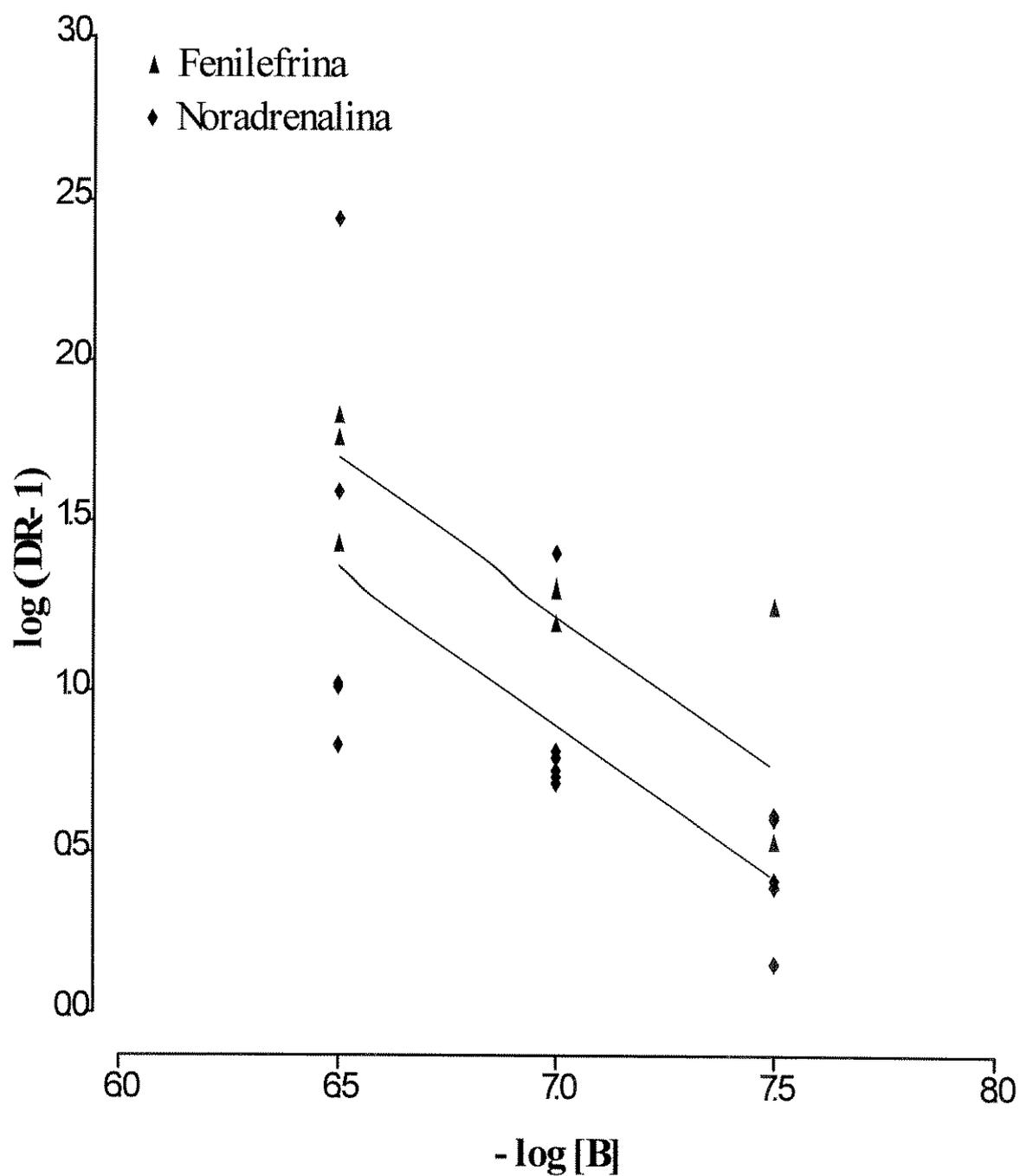


Figura 9 - Gráfico de Schild para o antagonismo do efeito da noradrenalina (reta inferior) ou da fenilefrina (reta superior) pelo prazosin.

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os valores pA_2 do prazosin utilizando a noradrenalina como agonista e aqueles obtidos quando o agonista utilizado foi a fenilefrina ($p > 0,05$ teste “t” de Student). Os coeficientes angulares das retas de regressão do gráfico de Schild não foram diferentes da unidade, tanto para noradrenalina ($\alpha = 0,85 \pm 0,14$), quanto para a fenilefrina ($\alpha = 0,94 \pm 0,17$). Além disso, os dados indicaram que com ambos os agonistas o prazosin comportou-se como antagonista competitivo.

Foram realizadas curvas dose-efeito à clonidina na presença de $1 \times 10^{-7} M$ de prazosin. Não foi observado desenvolvimento de tensão nestas curvas, porém foram observadas pequenas contrações fásicas nas doses de agonista maiores que $1 \times 10^{-6} M$ (Figura 10).

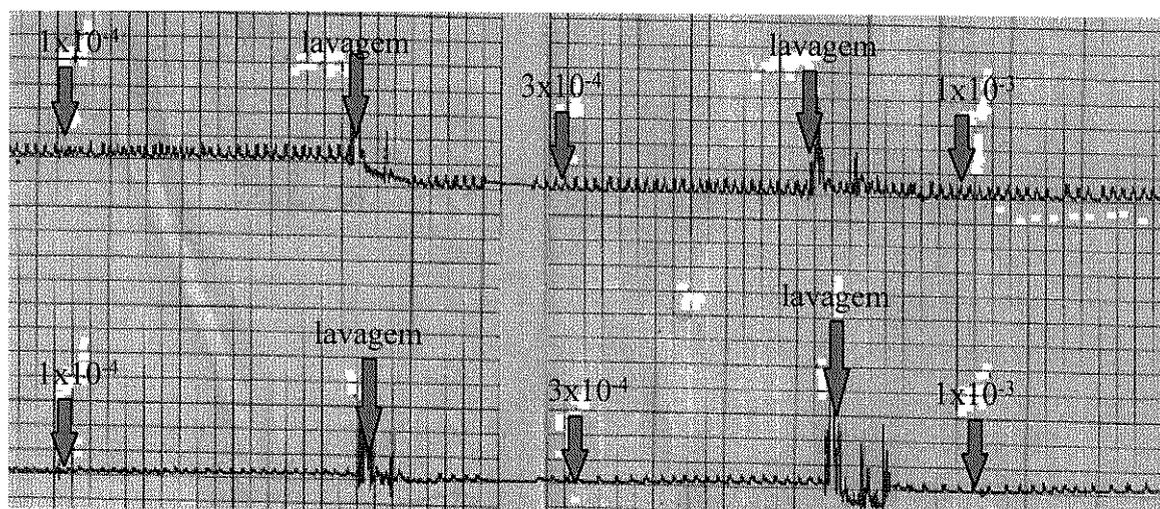


Figura 10- Dois registros de curvas dose-efeito à clonidina demonstradas na faixa de 10^{-4} à $10^{-3} M$ em ductos distintos. As curvas dose efeito à clonidina foram realizadas na presença de $10^{-7} M$ de prazosin.

Resposta à Tiramina

Para a comprovação de que liberações de noradrenalina endógena não estivessem alterando a resposta provocada pela

noradrenalina exógena, realizaram-se experimentos na presença da tiramina (10^{-4}M). Não foram obtidas contrações mensuráveis em resposta à tiramina, embora as preparações respondessem à noradrenalina exógena quando esta foi administrada (Figura 11).

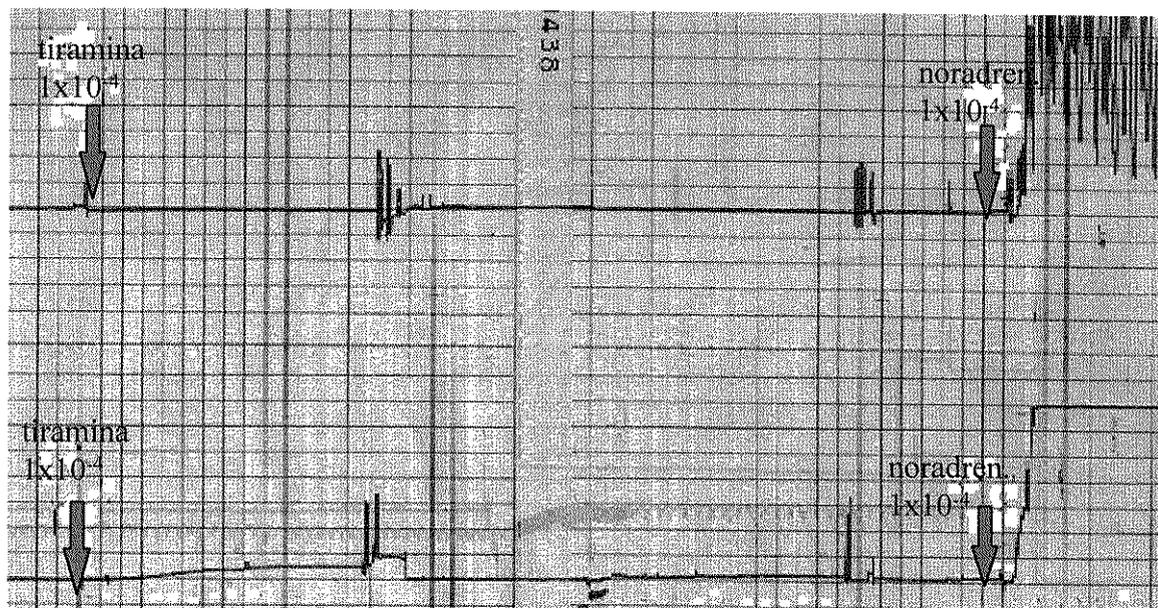


Figura 11- Dois registros de respostas à tiramina (10^{-4}M) e à dose única de noradrenalina (10^{-4}M) em ductos distintos.

Sistemas metabólicos das catecolaminas

Foram realizados experimentos com bloqueio da recaptação neuronal, da captação extra neuronal e de ambas, simultaneamente. Na Tabela 6 pode-se observar os valores médios de pD_2 e resposta máxima obtidos em curvas dose-efeito à noradrenalina, na ausência e na presença de desipramina (10^{-6}M), nas quais não foram verificadas alterações significativas, tanto com relação à resposta máxima (ANOVA $F_{(3,12)}=4,17$ $p<0,05$; Tukey $p>0,05$) quanto com relação ao pD_2 (ANOVA $F_{(3,12)}= 1,06$ $p>0,05$) das curvas dose-efeito na presença do bloqueador.

Na mesma Tabela 6 estão demonstrados os valores pD_2 e resposta máxima das curvas dose-efeito à noradrenalina, após inibição da

captação extra-neuronal através da corticosterona (10 μ g/ml). Este procedimento não causou alterações em relação ao controle tanto em relação à resposta máxima (ANOVA $F_{(3,12)}=4,17$ $p<0,05$; Tukey $p>0,05$) quanto ao pD_2 (ANOVA $F_{(3,12)}= 1,06$ $p>0,05$).

Os resultados obtidos com ambas as vias metabólicas bloqueadas podem também ser visualizados através da Tabela 6. Neste caso, foram observadas aumentos significativos da resposta máxima (ANOVA $F_{(3,12)}=4,17$ $p<0,05$; Tukey $p<0,05$) mas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os valores pD_2 (ANOVA $F_{(3,12)}= 1,06$ $p>0,05$). As curvas dose-efeito podem ser visualizadas na Figura 12.

Tabela 6- Valores pD_2 e resposta máxima à noradrenalina, na presença e na ausência de bloqueadores dos sistemas de metabolização.

| <i>Bloqueador de captação utilizado</i> | <i>pD_2^a</i> | <i>RMax^b (gf/g de tec.)</i> | <i>n^c</i> |
|---|----------------------------|--|----------------------|
| controle | 4,86 \pm 0,08 | 13,28 \pm 2,42 ^A | 5 |
| desipramina | 4,61 \pm 0,13 | 25,35 \pm 1,79 ^{A,B} | 3 |
| corticosterona | 4,96 \pm 0,14 | 21,34 \pm 4,12 ^{A,B} | 4 |
| desipramina + corticosterona | 4,79 \pm 0,19 | 27,81 \pm 3,86 ^B | 4 |

ANOVA $F_{(3,12)}=4,17$ $p<0,05$

A, B- letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa; teste Tukey, $p<0,05$

a- valor médio dos logaritmos negativos das doses do agonista que produzem uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima \pm erro padrão da média

b- valor médio das respostas máximas obtidas, expressas em gf/g de tecido úmido \pm erro padrão da média

c- número de experimentos realizados

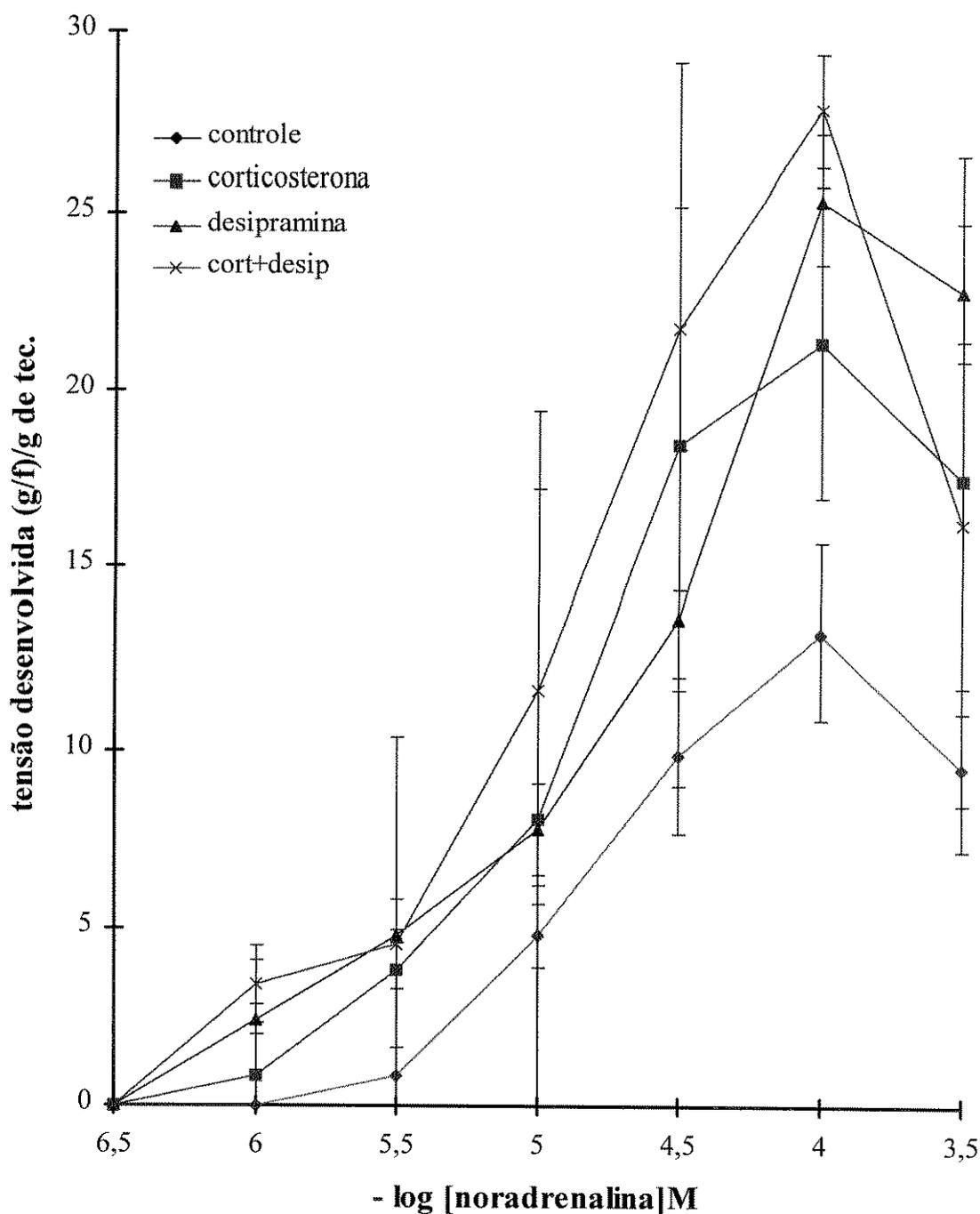


Figura 12- Curva dose-efeito à noradrenalina na ausência e na presença de desipramina ($10^{-5}M$), corticosterona ($10 \mu g/ml$) ou desipramina ($10^{-5}M$) e corticosterona ($10 \mu g/ml$) concomitantemente. As barras verticais indicam o erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos

Curva dose-efeito na presença de nifedipina

A Tabela 7 mostra os valores e a Figura 13 mostra as curvas dose-efeito à noradrenalina na ausência (controle) e na presença de nifedipina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$). Pode se observar uma diminuição significativa da resposta máxima ($p < 0,05$ teste “t” de Student), ressaltando a participação dos canais de cálcio voltagem-dependentes e do cálcio extracelular no processo contrátil da camada muscular circular do ducto deferente humano.

Tabela 7- Valores médios de pD_2 e Resposta máxima de curvas dose-efeito à noradrenalina na ausência (controle) e presença de nifedipina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), um bloqueador de canais de cálcio acoplado a receptores.

| <i>Bloqueador de canais de cálcio</i> | pD_2^a | $RMax^b$ (gf/g de tec.) | n^c |
|---------------------------------------|-----------|----------------------------|-------|
| controle | 4,88±0,07 | 11,63±1,39 | 5 |
| nifedipina | 5,39±0,01 | 5,11±0,71* | 4 |

*- teste “t” de Student, $p < 0,05$

a- valor médio dos logaritmos negativos das doses de agonista que produzem uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima ± erro padrão da média

b- valor médio das respostas máximas obtidas, expressas em gf/g de tecido úmido ± erro padrão da média

c- número de experimentos realizados

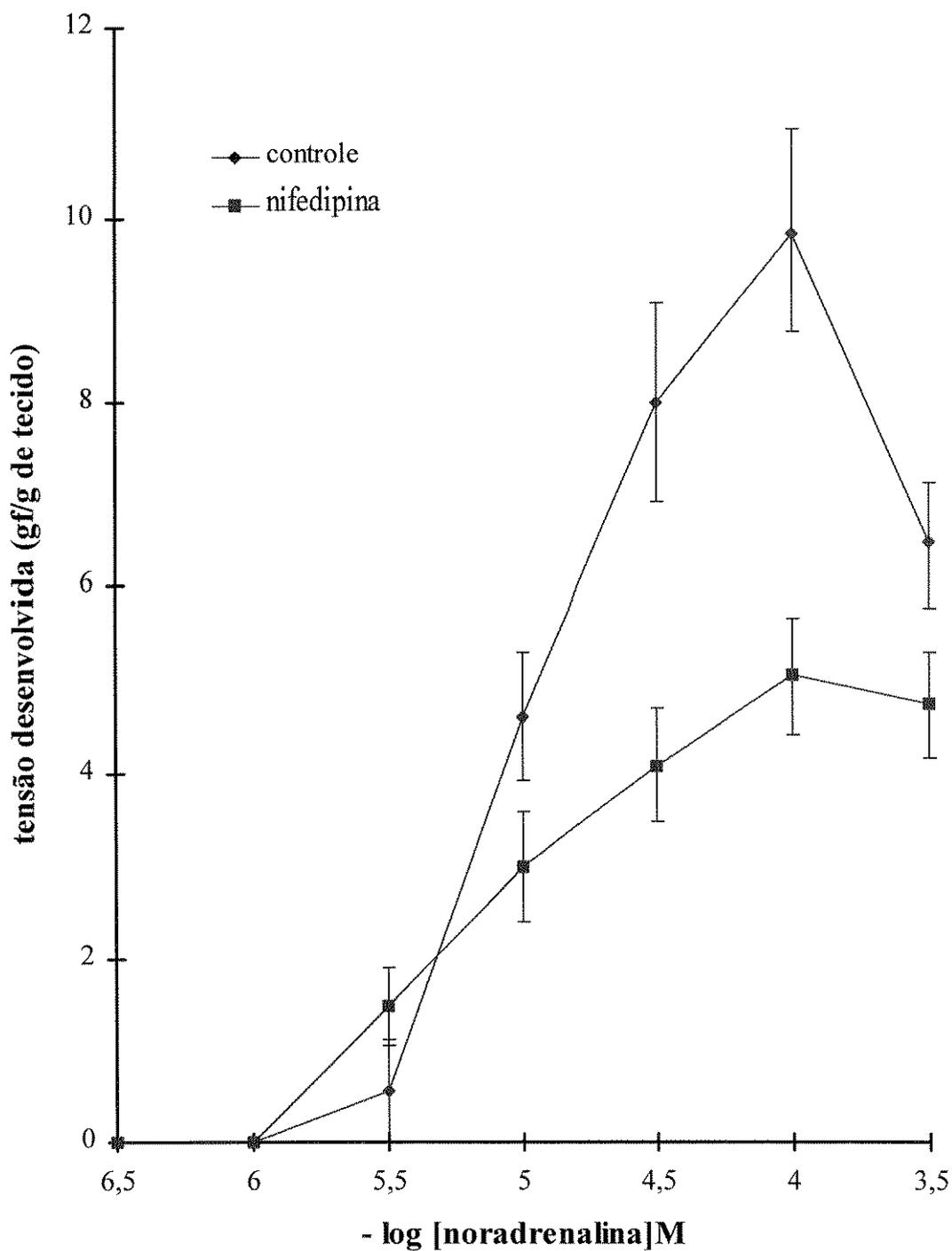


Figura 13- Curva dose-efeito à noradrenalina na ausência e na presença de $1 \times 10^{-6}M$ de nifedipina. As barras verticais indicam o erro padrão da média de pelo menos quatro experimentos.

DISCUSSÃO

Foram utilizadas, neste trabalho, três metodologias clássicas de cortes para estudo da camada muscular circular descritas na literatura (VANE, 1957; FURCHGOT & BADRAKOM, 1953 e CASTILLO & DE BEER, 1947), com as quais foram obtidas curvas dose-efeito à noradrenalina, que comparadas entre si, mostrariam qual preparação seria mais sensível. Foram utilizados dois parâmetros de comparação; resposta máxima e o valor pD_2 ; assim sendo, a curva que se apresentasse mais deslocada à esquerda e/ou que tivesse maior resposta máxima seria escolhida para os experimentos subsequentes.

A nível de resposta máxima foi constatada uma diferença estatisticamente significativa entre a preparação em anéis e as preparações em espiral e cortes transversais alternados. Esta diferença já fez com que fosse descartada a preparação em anéis que mostrou resposta máxima inferior às outras duas. Entre as outras preparações, espiral e CTA, não foi detectada diferença; neste caso, o outro parâmetro de comparação, o pD_2 , foi considerado. A nível de pD_2 , constatou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois modelos, mostrando que a preparação em espiral é cerca de 3,5 vezes mais sensível que a preparação em CTA. Portanto, foi definido que a melhor preparação a ser utilizada para o estudo da camada muscular circular interna do ducto deferente humano era aquela em espiral.

Assim que foi determinada a preparação mais adequada ao objetivo deste trabalho, procurou-se determinar quais eram os receptores que efetivamente participavam da contração da camada muscular circular interna do ducto deferente humano. Dados na literatura indicavam que o sistema adrenérgico era o principal responsável pela contração do ducto

deferente humano (ANTON & MCGRATH, 1977; HAN et al., 1987a e b, HOLMQUIST et al., 1990 e AMOBI & SMITH, 1995). Embora alguns autores também descrevessem a participação de receptores colinérgicos (HEDLUND et al., 1985; MIRANDA et al., 1992), outros afirmavam que estes não participavam do controle da atividade contrátil do tecido (MCLEOD et al., 1973; ANTON & MCGRATH, 1977 e CANEVARI et al., 1986). Nas condições utilizadas neste trabalho não foram obtidos resultados mensuráveis a agonistas colinérgicos, confirmando os resultados obtidos anteriormente pelos últimos autores.

Entretanto, outros estudos devem ser feitos levando em conta a porção do ducto que está sendo empregada, já que este fato parece ser de importância. Segundo ANTON & MCGRATH (1977) e AMOBI & SMITH (1995), diferentes regiões do ducto deferente humano possuem populações de receptores diferenciadas umas das outras. Assim a camada muscular externa (longitudinal) possui uma população de receptores diferentes da camada muscular circular interna. Esta variação da população de receptores pode também ser observada em outro critério de classificação, baseado nas regiões em que pode ser dividido o ducto deferente, epididimal, mediana e prostática (VARDOLOV & PENNEFATHER, 1976 e KASUYA & SUZUKI, 1979)

Não tendo sido possível demonstrar a presença de receptores muscarínicos, procurou-se determinar a presença dos receptores adrenérgicos na preparação selecionada. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a preparação não responde ao isoproterenol, um agonista seletivo de adrenoceptores do tipo β , confirmando os resultados de CANEVARI et al. (1986) e AMOBI & SMITH (1995). No entanto, verificou-se que a musculatura circular do ducto deferente humano respondeu bem à noradrenalina como já havia sido demonstrado por

CANEVARI et al. (1986), SMITH & BRAY (1990), HOLMQUIST et al. (1990) e AMOBI & SMITH (1995). Considerando que a noradrenalina é um agonista de adrenoceptores α não seletivo para os subtipos, analisou-se a resposta à fenilefrina, um agonista seletivo para adrenoceptores α_1 . Verificou-se que, embora as potências dos dois agonistas não apresentassem diferenças estatisticamente significativas, a resposta máxima à fenilefrina apresentou um valor cerca de duas vezes superior àquela da noradrenalina. A explicação para este fato seria uma combinação de fatores como diferenças de eficiência no acoplamento do agonista aos receptores que geram o estímulo-resposta e eficácia intrínseca dos diferentes agonistas (KENAKIN, 1984; SALLES & BADIA, 1991; AMOBI & SMITH, 1995).

Na tentativa de melhor compreender estes resultados passou-se a analisar o efeito do antagonista α_1 seletivo, prazosin, sobre as curvas dose-efeito aos dois agonistas de adrenoceptores. O prazosin provocou deslocamentos dose-dependentes à direita, das curvas dos agonistas confirmando que o efeito dos agonistas é mediado por receptores α_1 -adrenérgicos. Estes resultados vem confirmar aqueles obtidos por HOLMQUIST et al. (1990).

As inclinações apresentadas pelas retas de regressão de Schild, frente à noradrenalina ou à fenilefrina, não foram estatisticamente diferentes da unidade, validando assim, os valores de pK_B obtidos como representativos do pA_2 deste antagonista, frente à uma população homogênea de adrenoceptores α_1 , e confirmando resultados anteriores (MCLEOD et al., 1973; ANTON & MCGRATH, 1977 e AMOBI & SMITH, 1995).

Quanto à homogeneidade da população de receptores α_1 envolvidos nesta resposta, independentemente do agonista utilizado, os

valores pA_2 assim como os valores de inclinação da reta do gráfico de Schild, foram iguais e não diferiram da unidade, o que indica a presença de antagonismo do tipo competitivo e confirma a existência de uma população homogênea de receptores α_1 -adrenérgicos, atuando na contração da camada circular (HOLMQUIST et al., 1990; SMITH & BRAY, 1990; AMOBI & SMITH, 1995 e FURUKAWA et al., 1995).

DOCHERTY et al. (1979) relataram em ductos deferentes de ratos a presença também de receptores α_2 -adrenérgicos pós-sinápticos, com predominância dos receptores α_1 . ILLES & STARKE (1983), relataram a presença de receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos, atuando como moduladores da resposta noradrenérgica no tecido do ducto deferente também em ratos.

Assim, foram realizadas curvas dose-efeito à clonidina na presença de prazosin. Este agonista de adrenoceptores α_2 não mostrou atividade em termos de desenvolvimento de tensão. Porém, em doses maiores que $10^{-6}M$, foram registradas contrações fásicas caracterizadas por pequenos picos. Estes dados confirmam aqueles obtidos por AMOBI & SMITH (1995) que relataram resposta semelhante. O objeto de estudo deste trabalho foram as contrações tônicas (desenvolvimento de tensão), no entanto, sugerimos estudos mais aprofundados com antagonistas competitivos seletivos α_2 -adrenérgicos no sentido de se verificar se existe alguma influência desta resposta fásica sobre a resposta tônica.

RATNASOORIYA et al. (1979) registraram resposta significativa à tiramina, embora 40% menor que aquela obtida para a noradrenalina. Esta resposta foi explicada como sendo devida à ação do fármaco sobre vesículas de noradrenalina no neurônio pré-juncional, rompendo-as. Com isto, haveria uma liberação de noradrenalina endógena provocando as contrações. Para obtê-las aqueles autores

realizaram curvas dose-efeito cumulativas, com intervalos entre doses de 0,5 à 1 minuto, em doses variáveis de 0,1 à 100 µg/ml de tiramina, em segmentos de ducto deferentes humanos, com todas as camadas musculares intactas (longitudinal externa, circular interna e longitudinal interna).

Entretanto, no trabalho aqui apresentado, não foram observadas respostas significativas à tiramina na dose de 10^{-4} M, utilizando-se somente a camada muscular circular interna do ducto deferente humano. A ausência da resposta pode estar relacionada com a camada muscular em estudo.

Uma vez caracterizado o receptor α_1 -adrenérgico como sendo o principal responsável pelo desenvolvimento da resposta tônica da camada muscular circular interna do ducto deferente humano, restava saber a qual sub-tipo pertencia o receptor presente nesta camada.

Os receptores adrenérgicos do tipo α_1 podem utilizar dois diferentes mecanismos de ativação de segundos mensageiros, de acordo com o subtipo de receptor em questão (HAN et al., 1987a e b). O cálcio, segundo mensageiro destes receptores, pode ser proveniente de diferentes estoques e liberado através de mecanismos distintos (MINNEMAN et al., 1988) tais como:

a) liberação de estoques intracelulares de cálcio, provenientes principalmente do retículo sarcoplasmático, através da ativação de receptores α_1 ligados à uma G-proteína. Esta proteína ativaria uma fosfolipase que seria responsável pela quebra do fosfatidilinositol na membrana citoplasmática, liberando o inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). O IP_3 atuaria em receptores específicos presentes nas membranas do retículo sarcoplasmático abrindo os canais iônicos de cálcio permitindo, deste

modo, a passagem do cátion para o citoplasma da célula (BERRIDGE, 1984).

b) abertura dos canais de cálcio acoplados ao receptor e canais de cálcio voltagem dependentes, localizados na membrana plasmática da célula muscular lisa (HAN et al., 1987b). Com a ligação do agonista ao receptor ocorreria uma seqüência de eventos que envolvem a ativação da proteína G a qual, por sua vez, ativaria a fosfolipase C. Esta catalisaria a hidrólise de fosfatidilinositóis ligados à membrana citoplasmática o que resultaria na formação de dois segundos mensageiros: IP_3 e diacilglicerol (BERRIDGE, 1984). Estes dois segundos mensageiros, atuam agora como liberadores e moduladores dos estoques internos de cálcio, respectivamente. O diacilglicerol liberado atua ainda sobre uma fosfoquinase C que, quando ativada, liga-se à membrana, causando a abertura de canais de cálcio (BURT et al., 1996). Com a abertura destes canais ocorreria o influxo de cálcio externo, despolarização da membrana, com posterior abertura de outros canais de cálcio voltagem-dependentes, alterando a concentração citoplasmática deste cátion.

Independente da via utilizada, o aumento da concentração citoplasmática de cálcio vai atuar sobre outras proteínas, causando um aumento no estado metabólico da célula, através da ativação de enzimas, como por exemplo, enzimas ligadas ao aumento de síntese de proteínas (IZZO & COLUCCI, 1994).

O receptor α_{1a} utiliza principalmente o cálcio extracelular pela via anteriormente descrita (HAN et al., 1987b). Dessa maneira com o uso de um bloqueador de cálcio (nifedipina, $10^{-6}M$), foi possível estudar se o receptor α_{1a} fazia parte da população α_1 da camada circular do ducto deferente humano. Conforme pôde ser observado, houve uma

diminuição significativa da resposta máxima do agonista (em torno de 50%), quando a preparação foi pré-tratada com nifedipina. Este resultado sugeriu que parte da resposta contrátil tônica da camada muscular circular interna do ducto deferente humano deva estar associada a receptores α_{1a} -adrenérgicos, os quais utilizam o cálcio extracelular através dos canais de cálcio acoplados a receptores e canais de cálcio voltagem-dependentes (HAN et al., 1987b; FOVAEUS et al., 1987 e BURT et al., 1996). Estes resultados confirmaram aqueles obtidos por HAN et al. (1987b) e AMOBI & SMITH (1995), que demonstraram uma população de aproximadamente 60% de receptores α_{1a} -adrenérgicos. A participação dos subtipos α_{1c} e α_{1d} precisa ser ainda analisada abrindo, assim, novas perspectivas para trabalhos futuros.

Também foram realizados experimentos para verificação dos sistemas de metabolização de catecolaminas. Para tal utilizaram-se fármacos que atuam sobre os sítios de captação de catecolaminas para o interior da célula, onde seriam metabolizadas. São duas as principais vias metabólicas das catecolaminas:

a) uma via localizada principalmente nos neurônios pré-juncionais, onde se encontra presente uma grande concentração de monoaminooxidase (MAO).

b) a outra via fica localizada nos tecidos efetores pós-juncionais na qual a catecol-orto-metil-transferase (COMT) constitui um importante sítio de metabolização do neurotransmissor.

O bloqueio dos sistemas metabólicos, mantém a concentração do agonista aplicado ou do neurotransmissor endógeno em níveis mais altos do que aqueles existentes na presença dos sistemas de metabolização. Quando estes sistemas estão funcionando, parte da catecolamina aplicada é progressivamente degradada pela metabolização

diminuindo, dessa maneira, a concentração do agonista que está em contato com o tecido. Assim o bloqueio de um ou ambos os sistemas permite avaliar a sua participação na resposta ao agonista.

Existem substâncias capazes de bloquear a captação neuronal, como a cocaína ou a desipramina, e outras capazes de bloquear a captação extraneuronal, como é o caso da corticosterona (AXELROD, 1966; KOPIN, 1972; BONISCH & TRENDELENBURG, 1974 e IVERSEN & SALT, 1970).

Neste trabalho foram estudados os efeitos da inibição da recaptação neuronal de noradrenalina pela desipramina. Observou-se que a elevação da resposta máxima à noradrenalina causada pela desipramina não foi significativa, também não ocorrendo diferença estatisticamente significativa com relação aos valores pD_2 . Quando a captação extraneuronal foi bloqueada pela corticosterona, também não ocorreram diferenças significativas de pD_2 e resposta máxima em relação à curva controle. O bloqueio de ambos os sistemas de captação simultaneamente, não alterou de maneira significativa os valores pD_2 , porém foram detectadas diferenças estatisticamente significativas com relação à resposta máxima. Os resultados aqui obtidos, são semelhantes àqueles obtidos por SOUZA BRITO (1985), para a camada circular de ductos deferentes de ratos, indicando que o sistema de metabolização extraneuronal é pouco efetivo. No entanto, no mesmo trabalho, foram observados deslocamentos à esquerda e aumento da resposta máxima quando o sistema bloqueado foi o da recaptação neuronal, diferente dos nossos resultados, onde só foram observadas diferenças quando os dois sistemas foram bloqueados simultaneamente. No trabalho desenvolvido por SOUZA BRITO (1985) os sistemas de metabolização não foram bloqueados simultaneamente.

Por não terem sido observados deslocamentos significativos à esquerda da curva dose efeito na presença dos bloqueadores, sugerem-se estudos mais detalhados para confirmação e melhor compreensão destes resultados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1- A preparação mais indicada para o estudo da camada muscular circular interna do ducto deferente humano é a preparação em espiral.

2- A preparação de camada muscular interna do ducto deferente humano, nas condições empregadas, mostrou-se insensível a agonistas colinérgicos, sugerindo ausência, uma população de receptores não representativa durante o processo contrátil, ou ainda uma população não detectada na porção empregada da camada circular do órgão.

3- O processo contrátil da camada circular interna do ducto deferente humano é fundamentalmente adrenérgico, atuando através de receptores do tipo α_1 .

4- Sugerimos que na camada muscular circular o sistemas de metabolização de catecolaminas é mais efetivo quando atua de maneira conjunta (recaptação neuronal e captação extraneuronal), necessitando porém, estudos mais aprofundados para uma melhor determinação do funcionamento dos sistemas de metabolização nesta parte do tecido.

5- Os estudos funcionais de utilização do cálcio permitiram ainda sugerir que parte da resposta a agonistas adrenérgicos pode ser atribuída a receptores do subtipo α_{1a} -adrenérgico, uma vez que este subtipo de receptor é o único que está ligado à utilização do cálcio extracelular como segundo mensageiro para desenvolvimento de contrações nesta região do tecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, P. On the autonomic innervation of the human vas deferens. **Brain Res. Bull.**, V. 9, p. 673, 1982.

AMBACHE, N., ABOO ZAR M. Evidence against adrenergic motor transmission in the guinea pig vas deferens. **J. Physiol. (Lond.)**, V. 216, p. 359, 1971.

AMOBI, N. & SMITH, I. C. H. Evidence for depolarization-induced responses of isolated human and rat vasa deferentia in Ca^{2+} -free media. **J. Physiol.**, V. 423, p. 58P, 1990.

AMOBI, N. & SMITH, I. C. H. Paradoxical effects of thioridazine on electromechanical coupling in the human and rat vas deferens. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 192, p. 343, 1991.

AMOBI, N. & SMITH, I. C. H. Effects of thioridazine on mechanical responses of human vas deferens induced by noradrenaline or potassium. **J. Reprod. Fertil.**, V. 95, p. 1, 1992.

AMOBI, N. & SMITH, I. C. H. The relative importance of extracellular and intracellular calcium in the responses of the human vas deferens to noradrenaline and potassium: a study using Ca^{2+} deprivation and Ca^{2+} antagonists. **J. Auton. Pharmacol.**, V. 13, p. 177, 1993.

AMOBI, N. & SMITH, I. C. H. The human vas deferens: correlation of response pattern to noradrenaline and histological structure. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 273, p. 25, 1995.

ANDERSSON, K. E.; FOVAEUS, M.; HEDLUND, H.; HOLMQUIST, F. & LUNDIN, S. Immunoreactive arginine vasopressin (AVP) and effects of AVP in the human vas deferens. **J. Urol.**, V. 140, p. 1054, 1988.

ANTON, P. G. & McGRATH, J. C. Further evidence for adrenergic transmission in the human vas deferens. **J. Physiol.**, V 273, p. 45, 1977.

ARUNLAKSHANA, O. & SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, V. 14, p. 48, 1959.

AXELROD, J. Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines: the enzymatic conversion of norepinephrine (NE) to epinephrine (E). **Pharmacol. Rev.**, V. 18, p. 95, 1966.

BAUMGARTEN, H. G.; HOLSTEIN, A. F. & ROSENGREN, E. Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, V. 120, p. 37, 1971.

BATRA, S. K. Sperm transport through vas deferens: Review of hypotheses and suggestions for a quantitative model. **Fertil. Steril.**, V 25, n. 2, p. 186, 1974.

BENTLEY, G. A. & SABINE, J. R. The effects of ganglion blocking and postganglionic sympatholytic drugs on preparations of the guinea pig vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, V 21, p. 190, 1963.

BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. **Biochem. J.**, V. 220, p. 345, 1984.

BESSE, J. C. & FURCHGOTT, R. F. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V. 197, n. 1, p. 66, 1976.

BIRMINGHAM, A. T. The human isolated vas deferens: its response to electrical stimulation and to drugs. **Proc. Br. J. Pharmacol.** 692P, nov., 1968.

BIRMINGHAM, A. T. Sympathetic denervation of the smooth muscle of the vas deferens. **J. Physiol. (Lond.)**, V. 206, p. 645, 1970.

BOEMINGHAUS, H. Beitrag zur physiologie des vas deferens **Arch. Clin. Chir.**, V. 139, p. 563, 1926.

BONISCH, H. & TRENDELENBURG, U. Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused

heart. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, V. 283, p. 191, 1974.

BURT, R. P.; CHAPPLE, C. R. & MARSHALL, I. The role of diacylglycerol and activation of protein kinase C in α_{1a} -adrenoceptor mediated contraction to noradrenaline of rat isolated epididymal vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, V. 117, p. 224, 1996.

CANEVARI, A.; PACIFICO, P.; CUGURRA, F.; GIGLIO, C. & NADALINI, V. F. Receptors mediating contraction of isolated human vas deferens. **Pharmacol. Res. Commun.**, V. 18, n. 9, p. 795, 1986.

CASTILLO, J.C. & DE BEER, E.J. Tracheal chain preparation for study of antispasmodics with particular reference to bronchodilator drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V. 90, p. 104, 1947.

COTECCHIA, S.; SCHWINN, D. A.; RANDALL, R. R.; LEFKOWITZ, R. F.; CARON, M. G. & KOBILKA, B. K. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, V. 85, p. 7159, 1988.

DOCHERTY, J. B.; MACDONALD, A. & MACGRATH, J. C. Further sub classification of α -adrenoceptor in the cardiovascular system, vas deferens and anococcygeus of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, V. 67, n. 3, p. 421P, 1979

FOVAEUS, M.; ANDERSSON, K. E. & HEDLUNG, H. Calcium channel blockade and contractile responses in the isolated human vas deferens. **J. Urol.**, V. 138, p. 654, 1987.

FURCHGOT, R.F. & BADRAKOM, S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V. 108, p. 128, 1953.

FURUKAWA, K.; ROSARIO, D. J.; SMITH, D. J.; CHAPPLE, C. R.; UCHIYAMA, T. & CHESS-WILLIAMS, R. α_{1a} -adrenoceptor-mediated contractile responses of the human vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, V. 116, p. 1605, 1995.

GOERTTLER, K. Die konstruktion der wand des menschlichen samenleiters und ihre funktionelle bedeuftung. **Gegenbaurs Morphol. Jahrb.**, V. 74, p. 550, 1934.

HAN, C.; ABEL, P. W. & MINNEMAN, K. P. Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. **Mol. Pharmacol.**, V. 32, p. 505, 1987a.

HAN, C.; ABEL, P. W.; & MINNEMAN, K. P. α_1 -adrenoceptor subtype linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. **Nature**, V. 329, p. 333, 1987b.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K. E. & LARSSON, B. Effect of drugs interacting with adrenoceptors and muscarinic receptors

in the epididymal and prostatic parts of the human isolated vas deferens. **J. Auton. Pharmacol.**, V. 5, p. 261, 1985.

HEDQVIST, P. & EULER, U. S. Von. Inhibition by α - and β -adrenoceptors of the twitch response to transmural stimulation in the guinea-pig vas deferens. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 40, p. 153, 1976.

HOFFER, A. P. The ultrastructure of the ductus deferens in man. **Biol. Reprod.**, V. 14, p. 425, 1976.

HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H. & ANDERSSON, K. E. Effects of the α_1 -adrenoceptor antagonist R-(-)-YM12617 on isolated human penile erectile tissue and vas deferens. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 186, p. 87, 1990.

HUBER, D. No-scalpel vasectomy: the transfer of a refined surgical technique from China to other countries. **Adv. Contracept.** V. 5, p. 217, 1989.

HUKOVIC, S. Responses of the isolated sympathetic nerve-ductus deferens preparation of the guinea pig. **Br. J. Pharmacol.**, V. 16, p. 188, 1961.

ILLES, P. & STARKE, K. An electrophysiological study of presynaptic α -adrenoceptors in the vas deferens of the mouse. **Br. J. Pharmacol.** V. 78, p. 365, 1983.

IVERSEN, L. L. & SALT, P. J. Inhibition of catecholamine uptake 2 by steroids in the isolated rat heart. **Br. J. Pharmacol.**, V. 40, p. 528, 1970.

IZZO, N. J. & COLUCCI, W. S. Regulation of α_{1b} -adrenergic receptor half-life: protein synthesis dependence and effect of norepinephrine. **Am. J. Physiol.**, V. 266, p. C771, 1994.

JENKINS, D. A.; MARSHALL, I. & NASMYTH, P. A. Is noradrenaline the motor transmitter in the mouse vas deferens? **J. Physiol.**, V. 254, p. 49, 1976.

JURKIEWICZ, A.; CARICATI-NETO, A.; SOUZA BRITO, A.R.M.; MULFORD, S.S. & BUSATTO, P.A. A double perfusion system with two-channel recording for the simultaneous study of the contractile responses of the circular and longitudinal smooth muscle layers of the rat vas deferens. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.** V.12, n. 7, p. 473, 1990.

KASUYA, Y. & GOTO, K. The mechanism of supersensitivity to norepinephrine induced by cocaine in rat isolated vas deferens. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 4, p. 355, 1968.

KASUYA, Y. & SUZUKI, N. Variation of post-junctional natures along the length of the rat vas deferens as a cause of regional difference in the sensitivity to norepinephrine. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, V. 241, p. 24, 1979

KENAKIN, T. P. The relative contribution of affinity and efficacy to agonist activity: organ selectivity of noradrenaline and oxymetazoline with reference to the classification of drug receptors. **Br. J. Pharmacol.**, V. **81**, p. 131, 1984

KOPIN, I. J. Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. Blaschko, H. and Muscholl, E., ed. **Catecholamine**. Berlin, Springer, 1972, p271 (Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. 33).

LAU, L. C.; ADAIKAN, P. G. & RATNAM, S. S. Effect of histamine on human vas deferens *in vitro*. **Br. J. Urol.** V. **64**, p. 423, 1989.

MACHT, D. I. A contribution to the physiology of the ureter and vas deferens. **J. Urol.**, V. **1**, p. 96, 1917.

MARTINS, T.; VALLE, J. R. & PORTO, A. Pharmacology of the human vas deferens and epididymis: the question of the endocrine control of the *in vitro* motility of the male accessory genitals. **J. Urol.**, V. **44**, p. 682, 1940.

MCLEOD, D. G.; REYNOLDS, D. G. & DEMAREE, G. E. Some pharmacological characteristics of the human vas deferens. **Invest. Urol.**, V. **10**, p. 338, 1973.

MINNEMAN, K. P. Binding properties of α_1 -adrenergic receptors in rat cerebral cortex: similarity to smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V. 227, p. 605, 1983.

MINNEMAN, K. P.; HAN, C. & ABEL, P. W. Comparison of α_1 -adrenergic receptor subtypes distinguished by chlorethylclonidine and WB 4101. **Mol. Pharmacol.**, V. 33, p. 509, 1988.

MIRANDA, H. F.; BUSTAMANTE, D.; CASTILLO, O.; SALVATIERRA, P.; SAAVEDRA, H.; FERNANDEZ, E.; PAEILE, T.; PELISSIER, T. & PINARDI, G. Cholinergic receptors in the human vas deferens. **J. Recept. Res.**, V. 12, n. 1, p. 101, 1992.

NISTAL, M.; SANTAMARIA, L.; PANIAGUA, R. The ampulla of the ductus deferens in man: morphological and ultrastructural aspects. **J. Anat.**, V. 180, p. 97, 1992.

NOREBERG, K. A.; RISLEY, P. L. & UNGERSTEDT, U. Adrenergic innervation of the male reproductive ducts in some mammals. **Z. Zellforsch.** V. 76, p. 278, 1967.

PABST R. Studies on the human ductus deferens. In: Schirren, C. Von. **Advances in andrology**, Vol.1. Berlin, Grosse Verlag GmbH, 1970.

PABST R. & LIPPERT H. Untersuchungen zu bau und funktion der muskelwand des ductus deferens. **Anat. Anz.**, V. 126, p. 543, 1970.

PANIAGUA, R.; REGADERA, J.; NISTAL, M. & ABAURREA, M. A. Histological, histochemical and ultrastructural variations along the length of the human vas deferens before and after puberty. **Acta Anat.**, V. 111, p. 190, 1981.

PEREZ, D. M.; PIASCIK, M. T.; MALIK, N.; GAIVIN, R. & GRAHAM, R. M. Cloning, expression and tissue distribution of the rat homolog of the bovine α_{1c} -adrenergic receptor provide evidence for its classification as the α_{1a} subtype. **Mol. Pharmacol.**, V. 46, p. 823, 1994.

RATNASOORIYA, W. D.; WADSWORTH, R. M. & GILMORE, D. P. The effect of sympathomimetic drugs on contractility of the vas deferens *in vitro* and *in vivo*. **J. Reprod. Fertil.**, V. 56, p. 633, 1979.

SALLES, J. & BADIA A. Mechanisms underlying the differential sensitivity to α_1 -adrenoceptor activation in the bisected rat vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, V. 102, p. 439, 1991.

SCHILD, H. O. pAy and competitive drug antagonism. **Br. J. Pharmacol.**, V. 2, p. 185, 1947

SJOSTRAND, N. O. The adrenergic innervation of the vas deferens and the accessory male genital glands. **Acta Physiol. Scand.**, V. **65 (Suppl 257)**, 1965.

SMITH, I. C. H. & BRAY, M. Direct and indirect contractile responses of the human vas deferens and actions of noradrenaline and of calcium antagonists. **Exp. Physiol.**, V. **75**, p. 33, 1990.

SOUZA-BRITO, A. R. M. **Propriedades farmacológicas da camada circular do ducto deferente de rato.** São Paulo, USP, 1985. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Escola Paulista de Medicina.

SOUZA-BRITO, A. R. M. & JURKIEWICZ, A. Some pharmacological properties of the circular smooth muscle layer of the rat vas deferens. **J. of Pharm. Pharmacol.**, V. **280**, p. 781, 1988.

SOUZA-BRITO, A. R. M.; MEDEIROS, I. A. & MARKUS, R. P. Do differences in innervation result in different post-synaptic responses to exogenous agonists? **Gen. Pharmacol.**, V. **20**, n. **1**, p. 65, 1989.

THOA, N. B. & MAENGWYN-DAVIES, G. D. The guinea pig isolated vas deferens: A method for increasing sensitivity to drugs. **J Pharm. Pharmacol.**, V. **20**, p. 873, 1968.

VANE, J. R. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, V. **12**, p. 344, 1957.

VARDOLOV, L & PENNEFATHER, J. N. Regional variation in the distribution of α -adrenoceptor in the vas deferens of the rat. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, V. 221, p. 212, 1976

VENTURA, W. P.; FREUND, M.; DAVIS, J. & PANNUTI, C. Influence of norepinephrine on the motility of the human vas deferens: a new hypothesis of sperm transport by the vas deferens. **Fertil. Steril.**, 24, n.1, p. 68, 1973.