



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**RENAN ARTHUR BOSIO GUIMARÃES**

**BLOQUEIO DAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR 6-NITRODOPAMINA EM  
DUCTO DEFERENTE HUMANO POR ANTAGONISTAS SELETIVOS ALFA1-  
ADRENÉRGICOS**

**CAMPINAS**

**2024**

**RENAN ARTHUR BOSIO GUIMARÃES**

**BLOQUEIO DAS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR 6-NITRODOPAMINA EM  
DUCTO DEFERENTE HUMANO POR ANTAGONISTAS SELETIVOS ALFA1-  
ADRENÉRGICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI  
COORIENTADOR: DR. JOSÉ BRITTO JÚNIOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO RENAN ARTHUR BOSIO GUIMARÃES, E ORIENTADO PELO  
PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

**Campinas  
2024**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B651b Bosio Guimarães, Renan Arthur, 1986-  
Bloqueio das concentrações induzidas por 6-nitrodopamina em ducto deferente humano por antagonistas seletivos alfa1-adrenérgicos / Renan Arthur Bosio Guimarães. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Gilberto de Nucci.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nitrocatecolaminas. 2. Óxido nítrico. 3. 6-nitrodopamina. 4. Ducto deferente. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Blockage of contractions induced by 6-nitrodopamine in human vas deferent duct by selective alpha1-adrenergic antagonists

**Palavras-chave em inglês:**

Nitrocathecolamines

Nitric oxid

6-nitrodopamine

Vas deferens

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Doutor em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gilberto de Nucci [Orientador]

Ubirajara Ferreira

Marcelo Nicolás Muscará

Alister de Miranda Cará

Cesario Bianchi Filho

**Data de defesa:** 08-05-2024

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3739-3058>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0676757645250662>

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**  
**RENAN ARTHUR BOSIO GUIMARÃES**

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI  
COORIENTADOR: DR. JOSÉ BRITTO JÚNIOR

**MEMBROS TITULARES:**

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci
2. Prof. Dr. Ubirajara Ferreira
3. Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará
4. Prof. Dr. Alister de Miranda Cará
5. Prof. Dr. Cesario Bianchi Filho

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 08/05/2024**

## AGRADECIMENTOS

---

**Agradeço a minha família Maria Assunta, José Márcio e Márcio pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida, sendo a base para a formação de meu caráter e sustentação para enfrentar percursos da vida.**

**Agradeço a minha esposa Ana Júlia, minha companheira de vida, compartilhadora dos bons momentos e auxiliadora nas dificuldades.**

**Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci por sua amizade e por aceitar, orientar e confiar a mim a produção deste projeto e de outros durante esta jornada.**

**Agradeço ao Prof. Dr. José Britto Júnior, por auxiliar em toda execução dessa produção de forma paciente e amigável.**

**Obrigado.**

## RESUMO

A 6-Nitrodopamina (6-ND) é liberada do ducto deferente humano e desempenha um papel modulador na ejaculação masculina. O uso terapêutico de antagonistas dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos está associado a anormalidades ejaculatórias. Avaliar o efeito dos antagonistas dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos nas contrações induzidas por 6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina no ducto deferente do epidídimo humano (DDEH). Os segmentos de DDEH foram suspensos em câmaras de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit aquecida e oxigenada. Curvas concentração-resposta cumulativas para catecolaminas (10 nM-300  $\mu$ M) foram construídas em segmentos DDEH pré-incubadas (30 min) com doxazosina (0,1-1 nM), tansulosina (1-10 nM), prazosina (10-100 nM) e/ou silodosina (0,1-10 nM). Os efeitos desses antagonistas dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos também foram avaliados nas contrações induzidas pela estimulação do campo elétrico (ECE, 2-32 Hz). A doxazosina (0,1 nM) causou reduções significativas nas contrações de DDEH induzidas por 6-ND sem afetar as contrações induzidas por dopamina, noradrenalina e adrenalina. Resultados semelhantes foram observados com tansulosina (1 nM) e prazosina (10 nM). Nestas concentrações, estes antagonistas dos receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1 reduziram largamente as contrações induzidas por ECE. A silodosina (1 nM) causou desvios para a direita dependentes da concentração das curvas concentração-resposta para 6-ND, mas não teve efeito nas contrações induzidas pela dopamina e adrenalina. A silodosina (0,1 nM) inibiu apenas as contrações induzidas pela noradrenalina. A silodosina a 1 nM, mas não a 0,1 nM, causou reduções significativas nas contrações induzidas por ECE. Os resultados reforçam o conceito de que o 6-ND desempenha um papel importante na contratilidade do ducto deferente humano e indicam que os distúrbios de ejaculação causados pela doxazosina, tansulosina, prazosina e silodosina no homem podem ser devidos à inibição das contrações induzidas pelo 6-ND. ND em vez das clássicas catecolaminas dopamina, noradrenalina e adrenalina.

Palavras-chave: nitrocatecolaminas, óxido nítrico, 6-nitrodopamina, ducto deferente.

## ABSTRACT

6-Nitrodopamine (6-ND) is released from human vas deferens and plays a modulatory role in the male ejaculation. Therapeutical use of  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonists is associated with ejaculatory abnormalities. To evaluate the effect of  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonists on the contractions induced by 6-ND, dopamine, noradrenaline, and adrenaline in the human epididymal vas deferens (HEVD). HEVD strips were suspended in glass chambers containing heated and oxygenated Krebs–Henseleit’s solution. Cumulative concentration–response curves to catecholamines (10 nM–300  $\mu$ M) were constructed in HEVD strips pre-incubated (30 min) with doxazosin (0.1–1 nM), tamsulosin (1–10 nM), prazosin (10–100 nM) and/or silodosin (0.1–10 nM). The effects of these  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonists were also evaluated in the electric-field stimulation (EFS, 2–32 Hz)-induced contractions. Doxazosin (0.1 nM) caused significant reductions in 6-ND-induced HEVD contractions without affecting the contractions induced by dopamine, noradrenaline, and adrenaline. Similar results were observed with tamsulosin (1 nM) and prazosin (10 nM). At these concentrations, these  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonists largely reduced the EFS-induced contractions. Silodosin (1 nM) caused concentration dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND but had no effect on the contractions induced by dopamine and adrenaline. Silodosin (0.1 nM) only inhibited the contractions induced by noradrenaline. Silodosin at 1 nM, but not at 0.1 nM, caused significant reductions in the EFS-induced contractions. The results reinforce the concept that 6-ND plays a major role in the human vas deferens contractility and indicate that the ejaculation disorders caused by doxazosin, tamsulosin, prazosin and silodosin cause in man, may be due to inhibition of the contractions induced by 6-ND rather than by the classical catecholamines dopamine, noradrenaline, and adrenaline.

Keywords: nitrocatecholamines, nitric oxide, 6-nitrodopamine, vas deferens.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**5-HT** - Serotonina;  
**6-ND** - 6-nitrodopamina;  
**6-NN** - 6-nitronoradrenalina;  
**AADC** - L-aminoácido aromático descarboxilase;  
**ADR** - Adrenalina;  
**ATP** -Trifosfato de adenosina;  
**COMT** - Catecol-O-metil transferase;  
**CaCl<sub>2</sub>** - Cloreto de cálcio;  
**Cl<sup>-</sup>** - Cloro;  
**D1-like** - Receptores dopaminérgicos da família D1 (D1 e D5);  
**D2-like** - Receptores dopaminérgicos da família D2 (D2, D3, D4);  
**DA** - Dopamina;  
**DDEH** - Ductos deferentes do epidídimo humano;  
**ECE** - Estimulação do campo elétrico;  
**EFS** - Estimulação do campo elétrico;  
**E<sub>max</sub>** - Efeito máximo do fármaco;  
**EMT** - Transportador extraneuronal de monoaminas;  
**GABA** - Ácido c-aminobutírico;  
**GABA-B** - Receptor gabaérgico subtipo B;  
**GPCR** - Receptores acoplados a proteína G;  
**Hz** – Hertz;  
**HUA** - Artérias umbilicais humana;  
**HUV** - Veias umbilicais humana;  
**ISRSs** - Inibidores seletivos de recaptção de serotonina;  
**KCl** - Cloreto de potássio;  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** - Fosfato de potássio monobásico;  
**KHS** - Krebs-Henseleit;  
**L-DOPA** - 3,4 dihidroxifenilalanina;  
**L-NAME** - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster;  
**MAO** - Monoamino-oxidase;  
**MAO-A** - Monoamino-oxidase A;  
**MAO-B** - Monoamino-oxidase B;  
**MgSO<sub>4</sub>** - Magnésio sulfato;  
**MHPG** - 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol;  
**mN** – Milinewton;  
**NA** - Noradrenalina;  
**Na<sup>+</sup>** - Sódio;  
**NaCl** - Cloreto de sódio;  
**NaHCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de sódio;  
**NANC** - não adrenérgicos não colinérgicos;  
**NET** - transportador de norepinefrina;  
**NK1** - Neurocinina-1;  
**nM** - Nanomolar;  
**NN** - Nitronoradrelina;  
**NO** - óxido nítrico;  
**NOS** - NO-sintases;  
**OCTs** - Transportadores de cátions orgânicos;  
**OT** - Ocitocina;

**P2** - Receptores purinérgicos-2;  
**pEC50** - logaritmo negativo do EC50;  
**PKA**- Proteína quinase A;  
**pM** - Picomolar;  
**SEM** - Média  $\pm$  erro padrão da média;  
**SNC** - Sistema Nervoso Central;  
**V** - Volts;  
**VMA** - Ácido vanililmandélico;  
**VMAT** - Transportador vesicular de monoaminas.

## SUMÁRIO

Item	Assunto	Página
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
1.1	Catecolaminas	11
1.2	Dopamina	13
1.3	6-Nitrodopamina	15
1.4	Anatomia do ducto deferente e características básicas	16
1.5	Neurofisiologia da Ejaculação	17
1.6	Farmacologia da ejaculação	19
1.6.1	Farmacologia periférica	20
1.6.2	Farmacologia da medula espinhal	22
1.6.3	Farmacologia cerebral	26
2	<b>OBJETIVOS</b>	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivo Específico	26
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
3.1	Participantes	27
3.2	Reagentes	27
3.3	Preparações dos ductos deferentes do epidídimo humano (DDEH)	27
3.4	Estimulação de campo elétrico (ECE) em preparações DDEH	28
3.5	Análise de Dados	28
4	<b>RESULTADOS</b>	29
4.1	<b>Artigo 1</b> - 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation	30
5	<b>DISCUSSÃO</b>	42
6	<b>CONCLUSÃO</b>	45
7	<b>REFERÊNCIAS</b>	46
8	<b>APÊNDICES</b>	58

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 CATECOLAMINAS

As catecolaminas são substâncias orgânicas, possuindo, estruturalmente, um grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno) unido, por uma ponte de etil, a um grupo de amina. Estas são observadas no sistema nervoso simpático periférico e na região medular da adrenal, estando distribuídas em várias áreas do sistema nervoso central.(1)

Dentre as catecolaminas principais estão a dopamina, norepinefrina e epinefrina, constituindo uma categoria de neurotransmissores químicos e hormonais.(2,3), ocupando posições essenciais na regulação dos processos fisiológicos, e sua desregulação relacionada com desenvolvimento de doenças endócrinas, cardiovasculares, neurológicas e psiquiátricas.(4,5)

A partir do aminoácido tirosina, que pode ser derivado pela via endógena ou exógena, ocorre a sintetização das catecolaminas. Na via endógena, a sintetização feita pelo fígado a partir da fenilalanina, envolvendo, como etapa inicial, a hidroxilação da tirosina em l-3,4- diidroxifenilalanina (L-DOPA) e sendo catalisada através da enzima tirosina hidroxilase. Observado sua formação, o composto L-DOPA sofre descarboxilação pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC), resultando em dopamina (DA).(3,6,7)

Para neurônios que utilizam a DA como neurotransmissor, não é observada outras modificações enzimáticas, já para neurônios que utilizam noradrenalina (NA), há atuação da enzima DA- $\beta$ -hidroxilase, convertendo DA em noradrenalina. Em neurônios que utilizam epinefrina, a enzima, feniletanolamina-N-metiltransferase é a responsável realizar conversão, através da catalização, de NE em epinefrina.(3,7)

Grande parte da epinefrina em células cromafins e terminações nervosas estão presentes em vesículas e, em menos quantidade, livre no citoplasma. O transportador vesicular de monoaminas (VMAT) mantêm a concentração da epinefrina nas vesículas, sendo análogo ao transportador de aminas responsável pela concentração de norepinefrina nas terminações nervosas, no entanto, utilizando, como força impulsora, o gradiente transvesicular de prótons (8,9)

Nas terminações nervosas noradrenérgicas ocorre a captura da norepinefrina, finalizando a ação deste transmissor liberado. Tanto epinefrina e

norepinefrina circulantes sofrem degradação enzimática, sendo que duas enzimas principais que atuam no metabolismo das catecolaminas estão presentes de modo intra-celular, logo, suas captações pelas células são primordiais para suas degradações metabólicas.(3,10,11)

Através do transportador de norepinefrina (NET), observado na membrana plasmática, é realizada a captura neuronal, atuando tais transportadores como cotransportadores de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e amina, através do gradiente eletroquímico, sendo Na<sup>+</sup> força motriz.(6,12)

O VMAT, através do gradiente de prótons entre citosol e conteúdo vesicular, participa do empacotamento do transmissor dentro de vesículas. Já a captura extraneuronal é concretizada através do transportador extraneuronal de monoaminas (EMT), pertencente a uma família de transportadores de cátions orgânicos (OCTs,)(12)

Possuindo característica de alta afinidade e a velocidade máxima de captura pequena, o NET, além de ter atributo mais seletivo para norepinefrina, tem relevância na manutenção dos estoques liberáveis desse composto. Já o EMT possui afinidade menor e capacidade maior de transporte que o NET, transportando isoprenalina, epinefrina e norepinefrina.(10)

Duas enzimas intracelulares são as principais responsáveis pela metabolização das catecolaminas: a monoamino-oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT). A MAO, que possui derivações MAO-A e MAO-B, está aderida à membrana externa das mitocôndrias, sendo abundante em terminações nervosas noradrenérgicas, no entanto, sendo também observada no fígado, no epitélio intestinal e em outros tecidos. (10,12)

As catecolaminas são convertidas, pela MAO, em aldeídos correspondentes, sendo rapidamente metabolizados periféricamente pela enzima aldeído desidrogenase em ácido carboxílico correspondente. Outras aminas, como dopamina e 5-HT também podem ser oxidadas pela MAO. (6,12)

A MAO ainda é importante regulando o conteúdo de dopamina e norepinefrina no interior dos neurônios simpático, além do estoque de norepinefrina, que pode ser elevada, em caso de inibição da enzima. Nas vias principais de metabolismo da norepinefrina, observa-se preponderância do ramo oxidativo, resultado no VMA como o principal metabólito urinário.(12) Já no ramo

reduzido, a produção do metabólito MHPG é menos abundante, sendo conjugado ao sulfato de MHPG antes de ser extinguido. (12)

Outra via de grande importância para a metabolização das catecolaminas ocorre com a metilação, através da COMT, de um dos grupos hidroxila do catecol, resultando em um derivado metoxi. A enzima COMT não está presente em neurônios noradrenérgicos, no entanto, é observada na medula da suprarrenal e outras células e tecidos.(12)

A substância formada pelas ações de MAO e COMT é o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), composto esse parcialmente conjugado a derivados sulfato ou glicuronídeo, sendo parte eliminados na urina, e sua maioria convertida em ácido vanililmandélico (VMA)(6,12)

MAO e COMT não são primariamente responsáveis na finalização da ação do transmissor periféricamente, sendo a maior parte da norepinefrina liberada recaptada pelo NET. As catecolaminas circulantes são captadas e inativadas por ação de NET, EMT e COMT, sendo a ocorrência e importância de cada processo variando de a depender do agente envolvido. Dessa forma, em geral, NET possui papel primordial na remoção da norepinefrina circulante e EMT sobre epinefrina. (6,8,12)

A atuação das catecolaminas se dá por ação endógena nos receptores adrenérgicos,  $\alpha$  1 e 2, e  $\beta$  1, 2 e 3, obtendo respostas diversas a depender do receptor e tecido. Já seus efeitos fisiológicos são mediados por receptores acoplados a proteína G (GPCR), controlando a sinalização do efetor, ou seja, o segundo mensageiro.(8,13–16)

## **1.2 DOPAMINA**

O composto dopamina (DA) foi sintetizado, pela primeira vez, em 1910, e, na década de 1930, foi reconhecida como substância de transição na síntese de NE e epinefrina. Em início da década de 1950 foram observados estoques de DA nos tecidos, indicando que apresentasse funcionalidade sinalizadora própria. No final da década de 1950, Carlsson e Montagu observaram estoques de DA no cérebro(17,18). Posteriormente, Hornykiewicz deparou-se com o déficit de DA no cérebro afetado pela doença de Parkinson, trazendo o interesse no papel da DA em doenças e distúrbios neurológicos. (19)

Estruturalmente, a DA é classificada como catecolamina, possuindo uma molécula catecol ligada a uma etilamina. O composto está intensamente relacionado com a melanina, o pigmento sendo formado por oxidação da DA, tirosina ou L-DOPA. A presença da melanina é encontrada na pele e cutícula, conferindo à tal substância enegrecida a sua denominação de cor escurecida. Tanto DA, quanto L-DOPA, são prontamente oxidados por vias não enzimáticas, desenvolvendo espécies reativas de oxigênio citotóxicas e quinonas. As quinonas desses compostos desenvolvem adutos com a-sinucleína, que é o principal constituinte dos corpos de Lewy, presentes na doença de Parkinson. Por ser uma molécula polar, a DA não atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica.(18,20–22)

A síntese da DA possui similaridade com a via biosintética da 5-HT, sendo fenilalanina e a tirosina precursores da DA. Após obtenção da fenilalanina em dieta, os mamíferos convertem este em tirosina, através da enzima fenilalanina hidroxilase. Ocorrendo uma redução nos níveis desta enzima, ocorre a elevação dos níveis de fenilalanina, gerando condição conhecida como fenilcetonúria, que impacta diretamente intelecto do indivíduo.(17,18,23)

O aminoácido tirosina atravessa com facilidade para o cérebro através da captação, sendo seus níveis cerebrais caracteristicamente saturantes, diferentemente do triptofano. A conversão de tirosina em L-DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina) dá-se através da enzima tirosina hidroxilase e é o passo limitante na síntese da DA. A tirosina hidroxilase possui função mista, necessitando de ferro e um cofator biopterina, têm sua atividade enzimática regulada por fosforilação e por inibição do produto final.(18,20,24)

Há identificadas, no ser humano, quatro isoformas emendadas de tirosina hidroxilase, não estando claro, até o momento, se possuem funções distintas. O L-DOPA é velozmente transformado em DA pela ação da AADC. Enzima esta que também produz 5-HT da L-5-hidroxitriptofano. (17,18,20,25)

Tanto no Sistema Nervoso Central, quanto na periferia, a ação da AADC é elevada, sendo os níveis basais de L-DOPA não facilmente mensuráveis. Diferentemente da DA, a L-DOPA atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica, sendo convertida em DA no cérebro, elucidando seu papel para o tratamento da doença de Parkinson. Os principais locais que possuem DA são a projeção que liga a substância negra ao neostriado e a projeção que

liga a região tegmentar ventral às estruturas límbicas, especialmente o córtex límbico. (18)

A atuação terapêutica da levodopa, fármaco antiparkinsoniano, está conexas a primeira projeção, e creditando-se aos fármacos antipsicóticos a atuação terapêutica esteja associada a segunda projeção. No mais, observa-se em neurônios que contêm dopamina no hipotálamo ventral importante função na regulação da função hipofisária.(22,26)

Existem identificados cinco receptores de dopamina, sendo subdivididos em duas categorias: semelhantes a D1 (D1 e D5) e semelhantes a D2 (D2, D3, D4). Todos estes são considerados metabotrópicos. Normalmente, a dopamina possui função inibitória lenta sobre neurônios do SNC, sendo essa função melhor visualizada em neurônios da substância negra, que contêm dopamina, nos quais a ativação do receptor D2 gera abertura dos canais de potássio pela proteína de acoplamento Gi.(23)

### **1.3 6-NITRODOPAMINA**

As nitrocatecolaminas, são tipos de catecolaminas, sendo nitronoradrenalina (NN) e nitroadrenalina isoladas de cérebro de rato(27) e 6-nitronoradrenalina (6-NN) foi observada em microdialisados do corno dorsal da medula espinhal de rato(28). Foi notado que o transporte de noradrenalina, em sinaptossomas de ratos, é inibido por 6-NN(29) e observado que a administração intratecal de 6-NN gera analgesia em decorrência da liberação de noradrenalina (28). Esse achados elucidam que as nitrocatecolaminas têm papel como mediadores neuronais no sistema nervoso central.

Estudo aponta que a liberação basal dependente do endotélio de dopamina (30) e 6-nitrodopamina (6-ND) foi demonstrada pela espectrometria de massa de Tandem em *Chelonoidis carbonaria* aorta (31). Observado também que os vasos do cordão umbilical humano (HUV) exibem liberação basal de dopamina (32) e 6-ND (33), sendo a síntese de 6-ND inibida pela incubação com o inibidor de síntese de óxido nítrico (NO) L-NAME. Outro dado em estudos apontou que o 6-ND modula a reatividade do HUCV por intermédio do antagonismo seletivo dos receptores dopaminérgicos tipo D2, elucidando que o 6-ND pode ter função moduladora além sistema nervoso central. (33). Em outro

artigo, em que se avaliou os anéis aórticos de *Pantherophis guttatus*, foi observado que a 6-nitrodopamina atuou como a principal catecolamina liberada, exercendo função vasodilatadora e papel como antagonista seletivo do receptor tipo D2 da dopamina. (34)

A avaliação da capacidade de modulação do cronotropismo atrial frente as catecolaminas clássicas foi realizada e obteve-se a constatação que a 6-nitrodopamina possui um mecanismo de ação duplo, gerando aumento na frequência atrial, independente da ativação da PKA, e liberação de catecolaminas dos terminais adrenérgicos.(35,36)

Sobre vasos periféricos humanos, verificou-se que a 6-nitrodopamina é a principal catecolamina liberada por tais vasos. A respeito da contratilidade da artéria e veia poplítea, a dopamina derivada do endotélio apresentou-se como agente contrátil considerável e, antagonistas seletivos do receptor D2 da dopamina, como a 6-nitrodopamina, demonstraram potencial terapêutico neste tipo de vasos. (37)

#### **1.4 ANATOMIA DO DUCTO DEFERENTE E CARACTERÍSTICAS BÁSICAS**

O ducto deferente aqui em destaque por sua utilização nesse trabalho, é um conduto muscular composto por três camadas musculares que possui como função o transporte de espermatozoides do epidídimo para a uretra, participando ativamente na emissão do evento ejaculação.

Sua morfologia e função tem semelhanças entre humanos e animais de diversas espécies. A estrutura é tubular, consistindo em uma camada muscular, uma mucosa interna e uma adventícia externa. A camada muscular, possui espessura de 1 a 1,5 mm, é uma camada circular cercada por outras camadas, de características longitudinais, interna e externa, sendo a mais proeminente e espiral. Já as camadas longitudinais são formadas por feixes musculares helicoidais, possuindo 30–40 µm de comprimento e 2–5 µm de diâmetro. O ducto deferente humano pode variar de comprimento entre 30 a 45 cm e é dividido em 5 partes: testicular, funicular, inguinal, pélvica e ampola do ducto deferente, este último unindo-se o ducto excretor da vesícula seminal e formando o ducto ejaculatório. (38–43)

As células musculares lisas estão intimamente relacionadas e associadas a outras 6 a 12 células, em lacunas próximas de 15 a 20 nm, proporcionando a propagação elétrica e despolarização. (44)

É uma estrutura muito utilizada como tecido modelo para avanços farmacológicos e fisiológicos do músculo liso, tanto por sua responsividade, quanto pela facilidade de obtenção da estrutura, que no caso de humano, adquirido facilmente após procedimento cirúrgico de vasectomia. Grande gama de medicamentos, especialmente os antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, possuem efeitos na contratilidade e, por consequência, na ejaculação normal, incorrendo em efeitos indesejados consideráveis aos pacientes, impactando diretamente na adesão a um tratamento. Uma observação mais aprofundada da farmacologia da inervação e dos neurotransmissores do ducto deferente demonstrou sua complexidade e um modelo para cotransmissão na sinapse. (38)

O suprimento arterial vem da artéria vesical inferior e sua inervação é realizada por fibras nervosas autonômicas pós-ganglionares, com origem, geralmente, em neurônios nos gânglios pélvicos e, em minoritariamente, de neurônios do gânglio mesentérico caudal e dos gânglios da cadeia simpática. Há presença ainda de fibras nervosas sensoriais, originadas dos gânglios da raiz dorsal. (43, 45-46)

## **1.5 NEUROFISIOLOGIA DA EJACULAÇÃO**

O processo de ejaculação é decorrente de dois eventos: a emissão e a expulsão. A emissão consiste na secreção de espermatozoides e componentes do líquido seminal na uretra prostática, no caminho que percorre testículos, epidídimo, ducto deferente, vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais. Após concluído o evento de emissão, o segundo evento, a expulsão, inicia-se com contrações rítmicas vigorosas de músculos estriados perineais e do esfíncter uretral estriado, com participação também do colo da bexiga, realizando a propulsão do sêmen. (38–40, 47–53)

Como mencionado, a expulsão advém de espasmos rítmicos dos músculos perineais e coordenação dos esfíncteres interno e externo da uretra, em decorrência da ação do sistema nervoso simpático. Conforme estudos apontam, considerando indivíduo jovem e saudável, obtêm-se uma média de 10

a 15 contrações por ejaculação, ocorrendo diminuição da frequência durante o orgasmo. (54–58)

Para a realização do evento de ejaculação, é imprescindível o papel ativo do sistema nervoso autônomo e do sistema nervoso somático, como também é essencial a função dos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC) realizando a modulação da atividade das glândulas acessórias. O sistema nervoso parassimpático é responsável pela secreção epitelial e o sistema nervoso simpático possui a função do controle de tônus contrações da musculatura lisa seminal.(57, 60–61)

Clinicamente, observa-se papel essencial do sistema nervoso simpático para o controle urogenital em homens, e condições patológicas como a anejaculação ou a ejaculação retrógrada estão documentadas em pacientes que apresentam lesões do nervo simpático eferente. Dados em estudos indicam que estimulação elétrica do plexo hipogástrico, que possuem neurônios simpáticos pós-ganglionares, torna possível a coleta do sêmen em homens paraplégicos. (57,59,62)

A ejaculação anterógrada é evento fisiológico que demanda sincronia perfeita entre a musculatura estriada da pelve e do esfíncter uretral externo, sendo o nervo pudendo responsável pela inervação dessas estruturas. Os nervos aferentes sensoriais genitais possuem também função essencial na ejaculação.(57,63–65)

A coluna vertebral possui certo papel de controle na ejaculação, em decorrência da ação de neurônios simpáticos pré-ganglionares que estão localizados na coluna intermediolateral e na coluna cinzenta dorsal (T12-L2), innervando a região urogenital. A inervação parassimpática pré-ganglionar da região urogenital é observada na coluna intermediolateral entre S2-S4. E, a respeito da inervação motora dos esfíncteres pelviperineal e uretral, os neurônios somáticos são responsáveis, sendo encontrados no núcleo de Onuf no corno ventral de S2-S4. Destaca-se também a presença de interneurônios espinhais, observado em modelos animais, como geradores de ejaculação. (54,57,60,61–64)

Na localização lombar de L3-L4, foi apontada uma região importante no ato ejaculatório, consistindo em segmentos de neurônios espinotalâmicos, que regulam os processos autônomos e somáticos (nervo pudendo), com intuito de iniciar a ejaculação. Tais interneurônios atuam sobre informações somatossensoriais, como os impulsos excitatórios e inibitórios supraespinhais. (54,57,59,61–64)

Já a respeito da regulação cerebral sobre a ejaculação, é um evento complexo, resultante da interação de diversos grupos neurais em diferentes localizações cerebrais, segmentados em áreas sensitiva/integrativa, excitatória e inibitória. As regiões cerebrais que são mais ativos no processo de ejaculação são a divisão pósteromedial do núcleo leito dos estriados terminais, a área pósterodorsal da amígdala, o núcleo pré-óptico pósterodorsal e a parte parvocelular do tálamo subparafascicular. (54,57,59,61)

## **1.6 FARMACOLOGIA DA EJACULAÇÃO**

### **1.6.1 FARMACOLOGIA PERIFÉRICA**

Algumas substâncias atuam periféricamente e tem papel de importância frente ao processo de ejaculação, como a noradrenalina, a acetilcolina, óxido nítrico, ocitocina, purinas, serotonina e receptores sensoriais.

Sobre a noradrenalina e acetilcolina, destaca-se que a inervação autonômica da genitália masculina é a chave no controle dos eventos periféricos que conduzem ao processo de ejaculação. Tais agentes simpaticomiméticos causam, mediado por receptores adrenérgicos alfa-1 em musculatura lisa, contrações de trato e glândulas sexuais, assim como colinomiméticos, através de receptores muscarínicos. Este último, ainda proporciona ação sobre a secreção de fluídos seminais das vesículas seminais. (66–68)

Já sobre o óxido nítrico (NO), suas fibras são componente importante do sistema autônomo NANC, sendo observados em todo trato seminal no homem. Estudos em tecido humano isolado demonstraram que o estímulo da via de sinalização intracelular do NO nas vesículas seminais resultou na redução da atividade contrátil musculatura lisa. (66, 69–70)

O hormônio oxitocina (OT) é sintetizado pela glândula pituitária e, em menor escala, pelos testículos e próstata. A substância leva à contração das células musculares lisas no trato urogenital por meio de mecanismos diretos e indiretos. Foi observado também a possibilidade de a substância promover o transporte de espermatozoides no ducto deferente. Indica-se que os níveis plasmáticos de OT estão relacionados positivamente com o processo de ejaculação, apesar de não apresentar clareza se a elevação de liberação de OT é uma causa ou uma consequência da ejaculação e se possui relação com o orgasmo. (66, 71–72)

A respeito dos receptores purinérgicos-2 (P2), estes são intensamente expressos em células musculares lisas no trato urogenital e comprovou realizar mediação da ação pró-contrátil do ATP nos canais deferentes. Apesar disso, o papel da via purinérgica precisa ser melhor investigado. (66, 73)

Sobre a serotonina (5-HT), não há relevante constatação sobre a funcionalidade a respeito do envolvimento da transmissão do 5-HT na genitália no processo de ejaculação. Quando observado *in vitro*, foi idealizado para inibição de contrações dos ductos deferentes e vesículas seminais em ratos. Já *in vivo*, foi apontado que o 5-HT intrauretral facilita o reflexo de expulsão do conteúdo mediante ação nos subtipos receptores 5-HT<sub>2</sub>. Como relatado mais adiante, o papel do 5-HT está mais presente centralmente. (66, 74–75)

A respeito dos receptores sensoriais periféricos, é apontado o papel fundamental dos estímulos sensoriais penianos na ejaculação, possuindo os anestésicos tópicos, em pauta combinação de lidocaína e prilocaína e também o extrato de ervas naturais asiáticas, elevando significativamente a latência da ejaculação em homens, quando apresentando o quadro de ejaculação precoce, após realizada aplicação local na glândula peniana. (66, 76)

### **1.6.2 FARMACOLOGIA DA MEDULA ESPINHAL**

Em decorrência da grande distribuição do ácido c-aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central, o GABA age em todos os processos neurofisiológicos centrais. Como exemplo da função GABA, a substância

baclofeno, antagonista dos subtipos de receptores GABA-B, quando distribuída no espaço subaracnóideo, visando alívio da espasticidade refratária na coluna vertebral pacientes com lesão medular e com esclerose múltipla, alterou também a condição do processo ejaculatório desses pacientes. Outros estudos detalharam o mecanismo de ação do GABA indicando, através de modelo de ejaculação provocada por microestimulação elétrica do gerador espinhal de ejaculação, impacto direto no bloqueio dos receptores GABA, gerando abolição da ejaculação. (77–78)

Já a oxitocina na medula espinhal, é sintetizada por neurônios parvocelulares presentes no núcleo paraventricular do hipotálamo, atuando também como neurotransmissor no SNC. Os terminais nervosos oxitocinérgicos foram observados nas colunas de células intermediolaterais da toracolombar e lombossacral, em estudo abordando ratos, em segmentos onde presentes os neurônios autônomos que inervam o trato urogenital. Observado que quando antagonista dos receptores OT distribuído por via intratecal teve papel na alteração da ejaculação em um modelo experimental de ejaculação induzida farmacologicamente. Acredita-se, portanto, então que as estruturas OTérgicas descendentes do núcleo paraventricular do hipotálamo regulam os centros autonômicos ejaculatórios espinhais. (79–80)

Quando versamos sobre o 5-HT na medula espinhal, uma rede estrutural de 5-HT foi detectada em células espinhais autonômicas e somáticas de centros ejaculatórios no rato. Existe grande quantidade de receptores 5-HT e seus subtipos nos centros ejaculatórios espinhais, com diferentes localizações celulares (pré/pós-sináptica, auto/heterorreceptores), e com propriedades farmacodinâmicas diversas (afinidade do ligante, ativadora/inibitória), indicando a complexidade para o real discernimento da função do 5-HT da medula espinhal na regulação da ejaculação. Há variedade de estudos farmacológicos, com resultados inclusive conflitantes, concluindo que o 5-HT possui efeito multinível e multimodal de ação nos mecanismos espinhais da ejaculação (desencadeamento/facilitação da ejaculação, inibição da expulsão). (79, 81–82)

Por fim, a substância P é um neurotransmissor que participa da transmissão de informações sensoriais da periferia para a medula espinhal, sendo produzida por neurônio sensoriais primários. Seu receptor, neurocinina-1

(NK1) é encontrado no rato pelos neurônios espinotalâmicos lombares. Foi demonstrado que a ocorrência de lesão neurotóxica seletiva da região lombar que apresenta NK1, levaram a supressão da ejaculação, no entanto sem alteração de outras respostas sexuais. O envolvimento desse receptor NK1 foi observado após modelo de ejaculação induzida farmacologicamente com injeção intratecal de antagonista seletivo. (66, 83–84)

Outros neurotransmissores apresentaram certo interesse para posteriores estudos complementares, como fragmento de octapeptídeo de colecistoquinina, galanina, peptídeo liberador de gastrina e peptídeo opioide endógeno encefalina. (82)

### **1.6.3 FARMACOLOGIA CEREBRAL**

O 5-HT em sua ação cerebral possui atenção especial, como pode-se observar na quantidade de estudos descritos utilizando os inibidores seletivos de recaptação de (ISRSs), rotineiramente prescritos como antidepressivos e já conhecido seus efeitos colaterais sexuais relacionados, como ejaculação retardada. (66)

Diante desse quadro, foi buscado uma nova abordagem terapêutica para ejaculação precoce, conduzindo ao registo do primeiro agente, dapoxetina, para esta indicação. Com o bloqueio dos transportadores de 5-HT, realizado pelos ISRS, ocorre elevação dos níveis extracelulares de 5-HT e, portanto, elevação da neurotransmissão 5-HTérgica no SNC. É apontado que essa elevação de 5-HT seja o responsável pelo prolongamento da latência do processo de ejaculação. (66)

Destaca-se que a dapoxetina teve como resultado um prolongamento da latência da ejaculação em indivíduos homens com diagnóstico de ejaculação precoce, quando medicados antes da relação sexual. Esses resultados clínicos com dapoxetina foi corroborado em um modelo experimental para ratos. (82, 85)

A maneira de ação do 5-HT no cérebro na regulação do processo de ejaculação é amplamente estudada e em alguns desses estudos foram encontrados resultados diferentes a depender do local onde o 5-HT é distribuído.

Quando a distribuição do 5-HT se concentra em áreas de projeção 5-HTérgica, como prosencéfalo e área pré-óptica medial, a ejaculação é retardada ou inibida. E, quando a distribuição é realizada em locais contendo corpos celulares de neurônios 5-HTérgicos, como núcleos da rafe, promoveram o comportamento ejaculatório. (66, 82, 86)

A função do 5-HT na lateral do hipotálamo foi estudado em ratos machos, sendo observado níveis extracelulares de 5-HT aumentados à medida que ocorria a ejaculação e também a elevação dos níveis extracelulares de 5-HT após da microinjeção local de ISRS que gerou inibição do comportamento sexual, indicando possibilidade de que o hipotálamo tem papel na determinação do período refratário pós-ejaculatório. (86)

Diante de todo o quadro apresentando, uma indicação precisa do papel da 5-HT é complexa devido a variedade de subtipos de receptores expressos no sistema nervoso central, sendo testados e observados os resultados da atuação de ligantes dos receptores 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2C em diferentes espécies de animais. (82, 86)

Em estudo, foi demonstrado que o estímulo dos receptores do subtipo 5-HT1A gerou melhora do comportamento ejaculatório no rato macho, sendo este subtipo de receptor de característica autorreceptor somatodendrítica, observado sua expressão em corpos celulares de neurônios 5-HT, e sua ativação diminui a despolarização de neurônio 5-HT, gerando, portanto, diminuição da liberação de 5-HT. Logo, o papel favorável para ejaculação por intermédio da ação dos agonistas 5-HT1A pode ser explanada pela diminuição do tom inibitório 5-HTérgico no mecanismo ejaculatório do sistema nervoso central. (66, 87)

Já o estímulo dos receptores subtipo 5-HT1B gerou a inibição do processo de ejaculação em ratos machos, sendo tais subtipos detectados em regiões pré-óptica medial e hipotálamo lateral. E, apesar desses subtipos de receptores são classificados como autorreceptores pré-sinápticos ou heterorreceptores pós-sinápticos, o meio exato da implicação do 5-HT1B ainda não está elucidado. (87)

Por fim, o estímulo dos receptores do subtipo 5-HT2A/C contribuiu para o comportamento inibitório da ejaculação no rato macho. Elementos neuroanatômicos indicam que o sistema límbico, como áreas núcleo accumbens

e amígdala, em que há alta concentração dos receptores subtipo 5-HT<sub>2A/C</sub> são observados podem ser o local de ação de ligantes 5-HT<sub>2A/C</sub>. (66, 88)

Outra via de neurotransmissão que tem sido explorada amplamente é a via dopaminérgica, mais especificamente a via incerto-hipotalâmica. Esta via possui em sua composição neurônios em que corpos celulares estão na zona incerta medial e no núcleo periventricular, e seus terminais estão no hipotálamo (áreas pré-óptico lateral e medial e divisão parvocelular do núcleo paraventricular), o tálamo e a substância cinzenta central do mesencéfalo. (82, 86, 89)

A dopamina possui atividade pró-ejaculatória e atividade pré-óptica medial é uma área chave da via incerto-hipotalâmica na mediação desse efeito. Os receptores semelhantes a dopamina D<sub>2</sub>, inclusos os subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>, foram observados, e apontado a relevância do subtipo D<sub>3</sub> após estudo com uso de antagonista seletivo D<sub>3</sub> em rato macho. (85, 90)

Em observação de estudo a respeito da anejaculação em pacientes que apresentam quadro de esquizofrenia e são tratados com classe antipsicótica dos antagonistas dos receptores do subtipo D<sub>2</sub>, a levosulpirida foi utilizada em tratamento em homens que apresentam ejaculação precoce, obtendo resultado com prolongação da latência da ejaculação. (91)

A respeito da ocitocina, os neurônios ocitocinérgicos parvocelulares no núcleo paraventricular hipotalâmico se projeta para múltiplas áreas do sistema nervoso central, compreendendo também estruturas cerebrais pertencentes à rede cerebral da ejaculação, como núcleo do leito da estria terminal, amígdala medial e área pré-óptica medial). (66)

Diante disso, o estímulo e o bloqueio dos receptores OT cerebrais promoveram e inibiram, de maneira respectiva, o comportamento ejaculatório. A implicação da ação direta na via e modulação OTérgica da neurotransmissão de 5-HT e dopamina são plausíveis mecanismos que regulam o efeito dos ligantes do receptor OT na resposta ejaculatória. No entanto, em seres humanos, estudo recente não apontou efeito significativo do antagonista de OT para pacientes com ejaculação precoce. (80, 82, 92–94)

Sobre a classe medicamentosa dos opioides, estudos buscaram definir o papel dessas drogas sobre o controle cerebral da ejaculação. Foram apontadas evidências demonstrando o efeito inibitório de opioides endógenos e agonistas de receptores opioides, principalmente subtipos L, em ratos machos. No ser humano apresentando ejaculação precoce, o opioide tramadol foi observada certa eficácia como tratamento, explicada pela dupla ação sobre os receptores opioides (agonista preferencial dos receptores I) e transportador 5- HT (função inibidora). (82, 95)

O papel de outros neurotransmissores é estudado e destaca-se alguns, como os peptídeos derivados da pró-opiomelanocortina (adrenocorticotropina e hormônio estimulador de melanócitos C) no controle cerebral da ejaculação no rato macho, mediante ação desses neuropeptídeos ativando receptores de alta afinidade, especialmente na área pré-óptica medial e hipotálamo lateral. Outros compostos são uma série de neuropeptídeos no circuito cerebral de ejaculação do rato, como por exemplo, a colecistocinina (fragmento de octapeptídeo), galanina e peptídeo tuberoinfundibular, observados em estruturas cerebrais, apesar de demandar maior elucidação de seu papel no controle da ejaculação. (66, 82)

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral desse estudo é realizar a análise do efeito da classe farmacológica dos antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos em contrações induzidas por 6-ND, dopamina, noradrenalina e adrenalina no ducto deferente do epidídimo humano.

### **2.2 Objetivo Específico**

O objetivo específico desse estudo é observar e estimar os efeitos dos fármacos doxazosina, tansulosina, prazosina e silodosina em contrações induzidas pela família das catecolaminas e ECE.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Participantes**

Os participantes realizaram cirurgia de vasectomia no Centro Clínico NotreDame Intermédicas (Jundiaí, São Paulo) e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Instituto de Revisão Institucional de Ciências Biomédicas (ICB-USP) Diretoria (Protocolo número 4.468.508). Os ductos deferentes do epidídimo humano (DDEH) foram adquiridos de 125 participantes com idade entre 28 e 59 anos. O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia local e o segmento excisado (comprimento de 1,5 cm) foi retirado em aproximadamente 9 cm da cauda do epidídimo. (96)

#### **3.2. Reagentes**

Os reagentes dopamina e prazosina foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, EUA). Adrenalina, noradrenalina e silodosina foram obtidas em Cayman Chemical Co (Michigan, EUA). 6-Nitrodopamina foi obtida da Toronto Research Chemicals (Ontário, CA). A tansulosina foi obtida da Swati Spentose Pvt Ltd (Vapi, Gujarat, Índia). A doxazosina foi adquirida da Nifty Labs Pvt Ltd (Hyderabad, Telangana, Índia). Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), magnésio sulfato (MgSO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e glicose foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

#### **3.3. Preparações dos ductos deferentes do epidídimo humano (DDEH)**

Os segmentos de DDEH (1,5 cm de comprimento) foram suspensos em câmara de vidro de 10 mL contendo KHS aquecido (37°C) e oxigenado (95%O<sub>2</sub>: 5%CO<sub>2</sub>). A tensão isométrica foi mantida em 10 mN e registrada por um sistema PowerLab (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia). Após um período de estabilização de 45 minutos, as tiras de DDEH foram inicialmente contraídas com cloreto de potássio (KCl, 80 mM) para avaliar a viabilidade tecidual. Após a remoção do KCl e retorno à linha de base (15 min aproximadamente), curvas cumulativas de concentração-resposta para 6-ND (0,00001-1 mM) foram construídas em segmentos controle de DDEH e em tecidos pré-incubados com doxazosina (0,1, 0,3 e 1 nM , 30 min), tansulosina (0,1, 1 e 10 nM, 30 min),

prazosina (10, 30 e 100 nM, 30 min) e/ou silodosina (0,1, 1, 3 e 10 nM, 30 min). Curvas cumulativas de concentração-resposta à noradrenalina foram construídas em DDEH pré-incubados ou não com doxazosina (0,1 nM, 30 min), tamsulosina (1 nM, 30 min), prazosina (10 nM, 30 min) e/ou silodosina (0,1 e 10 nM, 30 minutos). Dopamina e adrenalina concentração-resposta cumulativa foram construídas em DDEH pré-incubados ou não com doxazosina (0,1 nM, 30 min), tamsulosina (1 nM, 30 min), prazosina (10 nM, 30 min) e/ou silodosina (1 nM, 30 minutos). Um experimento típico dura 2,5-3 h (30 min para configurar o tecido, 45 min para estabilização, 15 min para avaliação de KCl, 30 min para incubação de drogas e 30 min para realizar a curva concentração-resposta.

### **3.4. Estimulação de campo elétrico (ECE) em preparações DDEH**

Os segmentos de DDEH foram submetidos a ECE (60 V por 20 segundos, 2-32 Hz em pulsos de onda quadrada, largura de pulso de 0,3 ms e atraso de 0,1 ms), utilizando um estimulador Grass S88 (Astro-Medical, Industrial Park, RI, EUA). As contrações de DDEH induzidas por ECE foram conduzidas em controle e tecidos pré-incubados com doxazosina (0,1 nM, 30 min), tamsulosina (1 nM, 30 min), prazosina (10 nM, 30 min) e/ou silodosina (0,1 e 1 nM, 30 minutos).

### **3.5. Análise de dados**

Os valores dos dados  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de  $n$  experimentos. Os valores de  $E_{max}$  foram expressos em mN. Um foi utilizado como resposta de controle e o outro DDEH foi incubado com um antagonista/inibidor.

Os valores de  $pA_2$  dos antagonistas foram calculados a partir da aplicação da equação;  $pA_2 = \log(\text{concentração do antagonista}) - \log(CR-1) - \log(\text{concentração do antagonista})$ . Os métodos para determinação de  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  foram descritos em outro trabalho do grupo. Foi empregado o teste  $t$  bicaudal não pareado de Student e as diferenças entre os grupos. Além disso, a ANOVA padrão, seguida do pós-teste de Newman-Keuls, foi utilizada quando mais de dois grupos estavam envolvidos. Um valor de  $p$  inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A distribuição dos valores  $\log(pEC_{50})$  foi normal para cada agonista, confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. (97–98)

## **4 RESULTADOS**

**4.1 Artigo** - Alpha1-adrenergic blockers selectively antagonize the contractions induced by 6-nitrodopamine in the human vas deferens

José Britto-Júnior, Renan Arthur Bosio Guimarães, Denis Lima Oliveira, Antonio Tiago Lima, Gilberto Quirino Junior, Gabriel Augusto de Oliveira Stocco, Edson Hiroshi Salgado Uramoto, Adriano Fregonesi, Edson Antunes, Gilberto De Nucci

**Revista:** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

**Situação:** Aceito em 19 de Outubro de 2023 / Publicado online em 01 de Novembro de 2023



## Alpha<sub>1</sub>-adrenergic blockers selectively antagonize the contractions induced by 6-nitrodopamine in the human vas deferens

José Britto-Júnior<sup>1</sup> · Renan Arthur Bosio Guimarães<sup>1</sup> · Denis Lima Oliveira<sup>1</sup> · Antonio Tiago Lima<sup>1</sup> · Gilberto Quirino Junior<sup>1</sup> · Gabriel Augusto de Oliveira Stocco<sup>1</sup> · Edson Hiroshi Salgado Uramoto<sup>2</sup> · Adriano Fregonesi<sup>1,2</sup> · Edson Antunes<sup>1</sup> · Gilberto De Nucci<sup>1,3,4</sup>

Received: 24 September 2023 / Accepted: 19 October 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

### Abstract

6-Nitrodopamine (6-ND) is released from human vas deferens and plays a modulatory role in the male ejaculation. Therapeutic use of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists is associated with ejaculatory abnormalities. To evaluate the effect of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists on the contractions induced by 6-ND, dopamine, noradrenaline, and adrenaline in the human epididymal vas deferens (HEVD). HEVD strips were suspended in glass chambers containing heated and oxygenated Krebs–Henseleit's solution. Cumulative concentration–response curves to catecholamines (10 nM–300  $\mu$ M) were constructed in HEVD strips pre-incubated (30 min) with doxazosin (0.1–1 nM), tamsulosin (1–10 nM), prazosin (10–100 nM) and/or silodosin (0.1–10 nM). The effects of these  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists were also evaluated in the electric-field stimulation (EFS, 2–32 Hz)-induced contractions. Doxazosin (0.1 nM) caused significant reductions in 6-ND-induced HEVD contractions without affecting the contractions induced by dopamine, noradrenaline, and adrenaline. Similar results were observed with tamsulosin (1 nM) and prazosin (10 nM). At these concentrations, these  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists largely reduced the EFS-induced contractions. Silodosin (1 nM) caused concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND but had no effect on the contractions induced by dopamine and adrenaline. Silodosin (0.1 nM) only inhibited the contractions induced by noradrenaline. Silodosin at 1 nM, but not at 0.1 nM, caused significant reductions in the EFS-induced contractions. The results reinforce the concept that 6-ND plays a major role in the human vas deferens contractility and indicate that the ejaculation disorders caused by doxazosin, tamsulosin, prazosin and silodosin cause in man, may be due to inhibition of the contractions induced by 6-ND rather than by the classical catecholamines dopamine, noradrenaline, and adrenaline.

**Keywords** Ejaculation · Delayed ejaculation ·  $\alpha$ -blockers

### Introduction

6-nitrodopamine (6-ND) is a novel catecholamine that is released from human umbilical cord vessels (Britto-Júnior et al. 2021a), human popliteal artery and vein (Oliveira et al. 2023) and human vas deferens (Britto-Júnior et al. 2022a), as detected by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Although in human vascular tissues 6-ND acts mainly as a potent vasorelaxant, in human vas deferens 6-ND causes smooth muscle contraction, which is blocked by tricyclic antidepressants such as amitriptyline and desipramine, at concentrations that do not affect the spasmogenic actions of dopamine, noradrenaline, and adrenaline (Britto-Júnior

José Britto-Júnior and Renan Arthur Bosio Guimarães contributed equally to this work.

✉ José Britto-Júnior  
[josebrittojr@dac.unicamp.br](mailto:josebrittojr@dac.unicamp.br)

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 126 Tessália Vieira de Camargo St, Campinas, São Paulo 13083-887, Brazil

<sup>2</sup> Department of Surgery, Faculty of Medicine of Jundiaí, Jundiaí, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

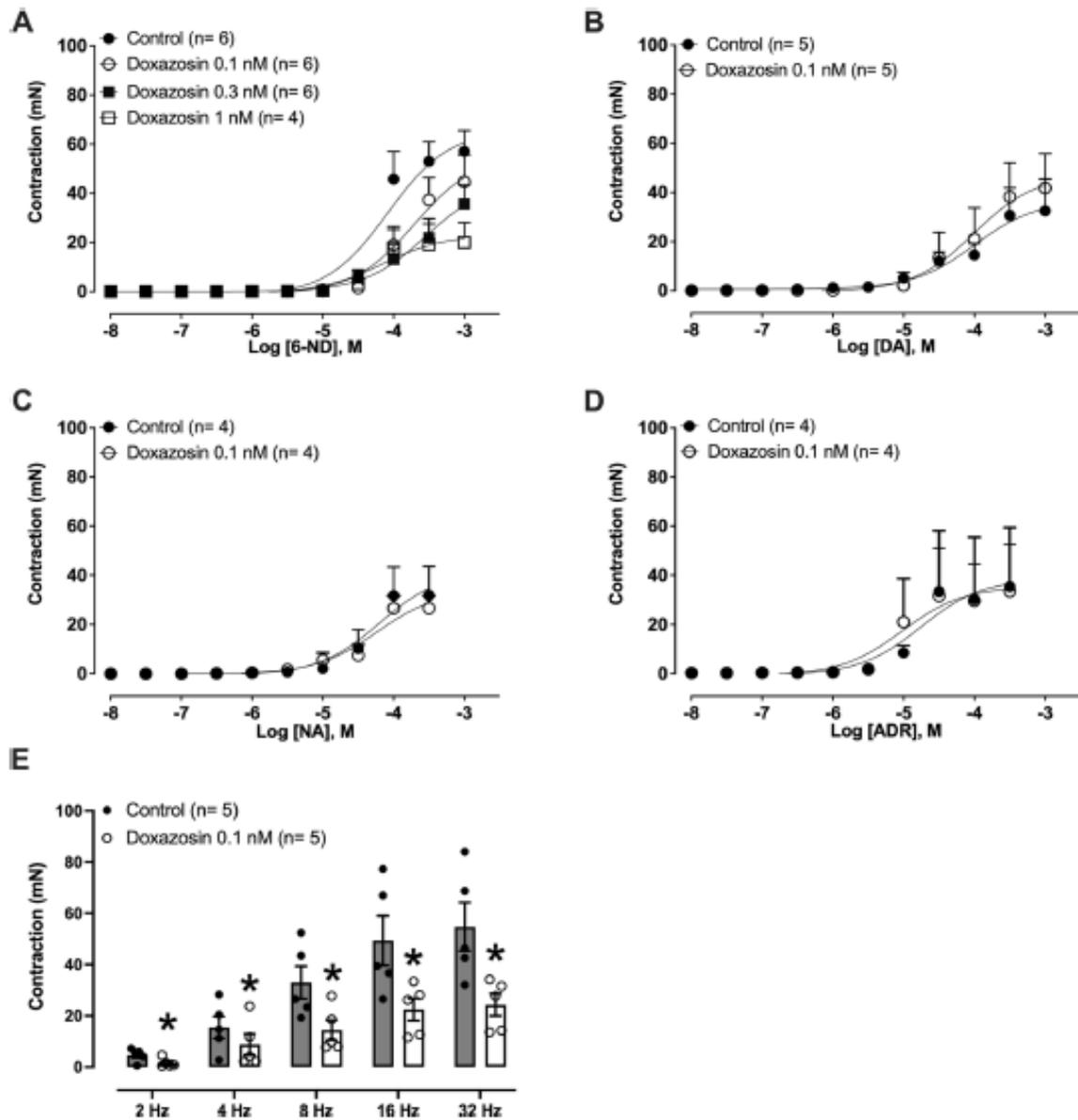
<sup>4</sup> Metropolitan University of Santos, Santos, Brazil

et al. 2022a). Similar results have been observed in the rat epididymal vas deferens (Britto-Júnior et al. 2021b).

The  $\alpha_1$ -adrenoceptor family is composed of three receptor subtypes, namely  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$  (Andersson 2000). All

three receptor subtypes are expressed in the human prostate, although in different locations (Walden et al. 1999).

Blockade of  $\alpha_1$ -adrenoceptors play an important role in the clinical management of patients with lower urinary tract



**Fig. 1** Effect of doxazosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Doxazosin (0.1–1 nM) induced concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Doxazosin (0.1 nM) had no effect on the contractions induced by dopa-

mine (DA, Panel B), noradrenaline (NA, Panel C) and adrenaline (ADR, Panel D). Doxazosin (0.1 nM; Panel E) caused significant inhibition of EFS-induced HEVD contractions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

symptoms (LUTS) caused by prostate hyperplasia (Roehrborn and Schwinn 2004), and the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists doxazosin, tamsulosin and silodosin are often used for LUTS relief (Debruyne 2000). Although the treatment with  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists is generally well tolerated, one of the most frequent adverse reactions is abnormal ejaculation, as characterized by delayed ejaculation or absence of ejaculation during orgasm (Cho and Yoo 2014). These adverse reactions could be due to inhibition of the emission phase of the ejaculation, in which the contraction of prostate, vas deferens, seminal vesicles and cauda epididymis occurs (Alwaal et al. 2015). Interestingly,  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists are now clinically used for the treatment of premature ejaculation (Gul et al. 2022).

In the rat isolated epididymal vas deferens, the contractions induced by 6-ND and by electric-field stimulation (EFS) are antagonized by pre-treatment of the vas deferens with doxazosin, tamsulosin, alfuzosin, terazosin and prazosin, at concentrations that do not block the contractions induced by dopamine, noradrenaline and adrenaline (Britto-Júnior et al. 2022b), indicating that these drugs could be acting as selective antagonists of 6-ND receptor rather than as  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists. Fluorescence histochemistry and biochemical detection of catecholamines revealed significant differences between rat and human vas deferens (Kaleczyc 1998), i.e., the former receives numerous adrenergic nerve fibres (Owman and Sjostrand 1965), whereas the latter presents less dense adrenergic innervation (Alm 1982; Baumgarten et al. 1968). Thus, we have investigated whether  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists would have inhibitory action on the contractions induced by 6-ND in human vas deferens.

## Materials and methods

### Study participants

Participants who underwent vasectomy surgery in Centro Clínico NotreDame Intermedicas (Jundiaí, Sao Paulo) signed an informed consent approved by the Institute of Biomedical Sciences (ICB-USP) Institutional Review Board (Protocol number 4.468.508). The human epididymal vas deferens (HEVD) were obtained from 125 participants aged 28–59 years. The surgical procedure (Rogers & Kolettis 2013) was performed under local anaesthesia and the excised segment (1.5 cm length) was taken at approximately 9 cm from the cauda epididymis.

### HEVD functional assays

The HEVD strips (1.5 cm length) were suspended in a 10-mL glass chamber containing heated (37°C) and

oxygenated (95%O<sub>2</sub>: 5%CO<sub>2</sub>) KHS. The isometric tension was kept at 10 mN and registered by a PowerLab system (ADInstruments, Dunedin, New Zealand). After a 45-min stabilization period, the HEVD strips were initially contracted with potassium chloride (KCl, 80 mM) to evaluate the tissue viability. After KCl removal and return to the baseline (15 min approximately), cumulative concentration–response curves to 6-ND (0.00001–1 mM) were constructed in control HEVD strips and in tissues pre-incubated with doxazosin (0.1, 0.3 and 1 nM, 30 min), tamsulosin (0.1, 1 and 10 nM, 30 min), prazosin (10, 30 and 100 nM, 30 min) and/or silodosin (0.1, 1, 3 and 10 nM, 30 min). Cumulative concentration–response curves to noradrenaline were constructed in HEVD pre-incubated or not with doxazosin (0.1 nM, 30 min), tamsulosin (1 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) and/or silodosin (0.1 and 10 nM, 30 min). Cumulative concentration–response dopamine and adrenaline were constructed in HEVD pre-incubated or not with doxazosin (0.1 nM, 30 min), tamsulosin (1 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) and/or silodosin (1 nM, 30 min). A typical experiment lasts 2.5–3 h (30 min to set up the tissue, 45 min for stabilization, 15 min for KCl evaluation, 30 min for drug incubation and 30 min to perform the concentration–response curve).

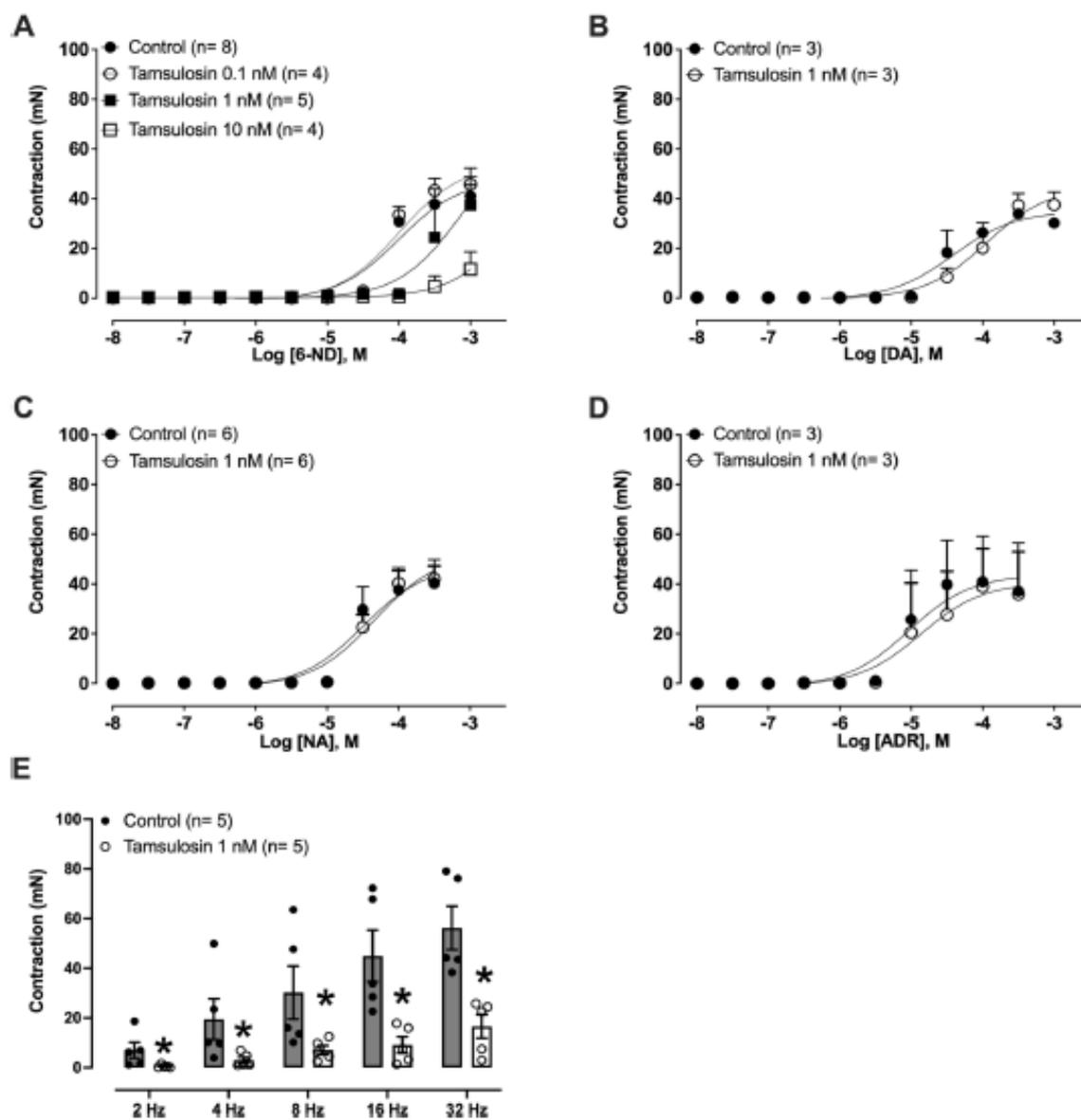
### Electric-field stimulation (EFS) in HEVD preparations

The HEVD strips were submitted to EFS (60 V for 20 s, at 2–32 Hz in square-wave pulses, 0.3 ms pulse width, and 0.1 ms delay), using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical,

**Table 1** The effect of doxazosin on the potency (pEC<sub>50</sub>) and maximal responses (E<sub>max</sub>) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA) in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	pEC <sub>50</sub> (log[M])	E <sub>max</sub> (mN)	n
6-ND	4.10 ± 0.15	57.08 ± 8.49	6
+doxazosin 0.1 nM	3.71 ± 0.19*	44.66 ± 10.98	6
+doxazosin 0.3 nM	3.54 ± 0.22*	35.66 ± 7.87*	6
+doxazosin 1 nM	4.20 ± 0.31	20.01 ± 8.10*	4
DA	3.99 ± 0.30	33.53 ± 12.01	6
+doxazosin 1 nM	4.01 ± 0.30	41.77 ± 13.98	6
NA	4.19 ± 0.14	31.9 ± 11.8	4
+doxazosin 1 nM	4.04 ± 0.31	26.7 ± 5.1	4
ADR	4.85 ± 0.19	35.4 ± 17.1	4
+doxazosin 1 nM	5.06 ± 0.52	33.6 ± 25.8	4

pEC<sub>50</sub> is defined as the negative logarithm of the EC<sub>50</sub>. E<sub>max</sub> is the maximal effect at the highest drug concentration. The pEC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> were expressed as mean ± SEM (n means the number of vas deferens strips). \*P < 0.05 compared with respective control values



**Fig. 2** Effect of tamsulosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Tamsulosin (1 and 10 nM) provoked concentration-dependent rightward shifts of the concentration-response curves to 6-ND (Panel A). Tamsulosin (1 nM) had no effect on the contractions induced by

dopamine (DA, Panel B), noradrenaline (NA, Panel C) and adrenaline (ADR, Panel D). Tamsulosin (1 nM; Panel E) caused significant inhibition of EFS-induced HEVD contractions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

**Table 2** The effect of tamsulosin on the potency ( $pEC_{50}$ ) and maximal responses ( $E_{max}$ ) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA) in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	$pEC_{50}$ (log[M])	$E_{max}$ (mN)	<i>n</i>
6-ND	4.01 ± 0.12	41.93 ± 4.52	8
+tamsulosin 0.1 nM	4.00 ± 0.10	45.75 ± 6.63	4
+tamsulosin 1 nM	3.45 ± 0.07*	37.36 ± 11.47	5
+tamsulosin 10 nM	-	11.58 ± 7.01*	4
DA	4.59 ± 0.22	30.23 ± 0.91	3
+tamsulosin 1 nM	4.03 ± 0.10	37.54 ± 5.06	3
NA	4.37 ± 0.11	40.32 ± 9.45	6
+tamsulosin 1 nM	4.38 ± 0.08	42.01 ± 5.21	6
ADR	5.03 ± 0.18	37.15 ± 19.33	3
+tamsulosin 1 nM	4.86 ± 0.24	35.93 ± 16.99	3

$pEC_{50}$  is defined as the negative logarithm of the  $EC_{50}$ .  $E_{max}$  is the maximal effect at the highest drug concentration. The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  were expressed as mean ± SEM (*n* means the number of vas deferens strips). – means that it was not possible to calculate the  $pEC_{50}$ , since at this concentration, the antagonist abolished the contractions induced by 6-ND. \* $P < 0.05$  compared with respective control values

Industrial Park, RI, USA). The EFS-induced HEVD contractions were conducted in control and tissues pre-incubated with doxazosin (0.1 nM, 30 min), tamsulosin (1 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) and/or silodosin (0.1 and 1 nM, 30 min).

## Materials and drugs

Dopamine and prazosin were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, USA). Adrenaline, noradrenaline and silodosin were purchased from Cayman Chemical Co (Michigan, USA). 6-Nitrodopamine was acquired from Toronto Research Chemicals (Ontario, CA). Tamsulosin was obtained from Swati Spentose Pvt Ltd (Vapi, Gujarat, India). Doxazosin was obtained from Nifty Labs Pvt Ltd (Hyderabad, Telangana, India). Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), calcium chloride ( $CaCl_2$ ), magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ), sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ ), potassium phosphate monobasic ( $KH_2PO_4$ ) and glucose were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

## Data analysis

The values of  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data represent the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of *n* experiments. Values of  $E_{max}$  were expressed in mN. One was used as the control response and the other HEVD was incubated with an antagonist / inhibitor.

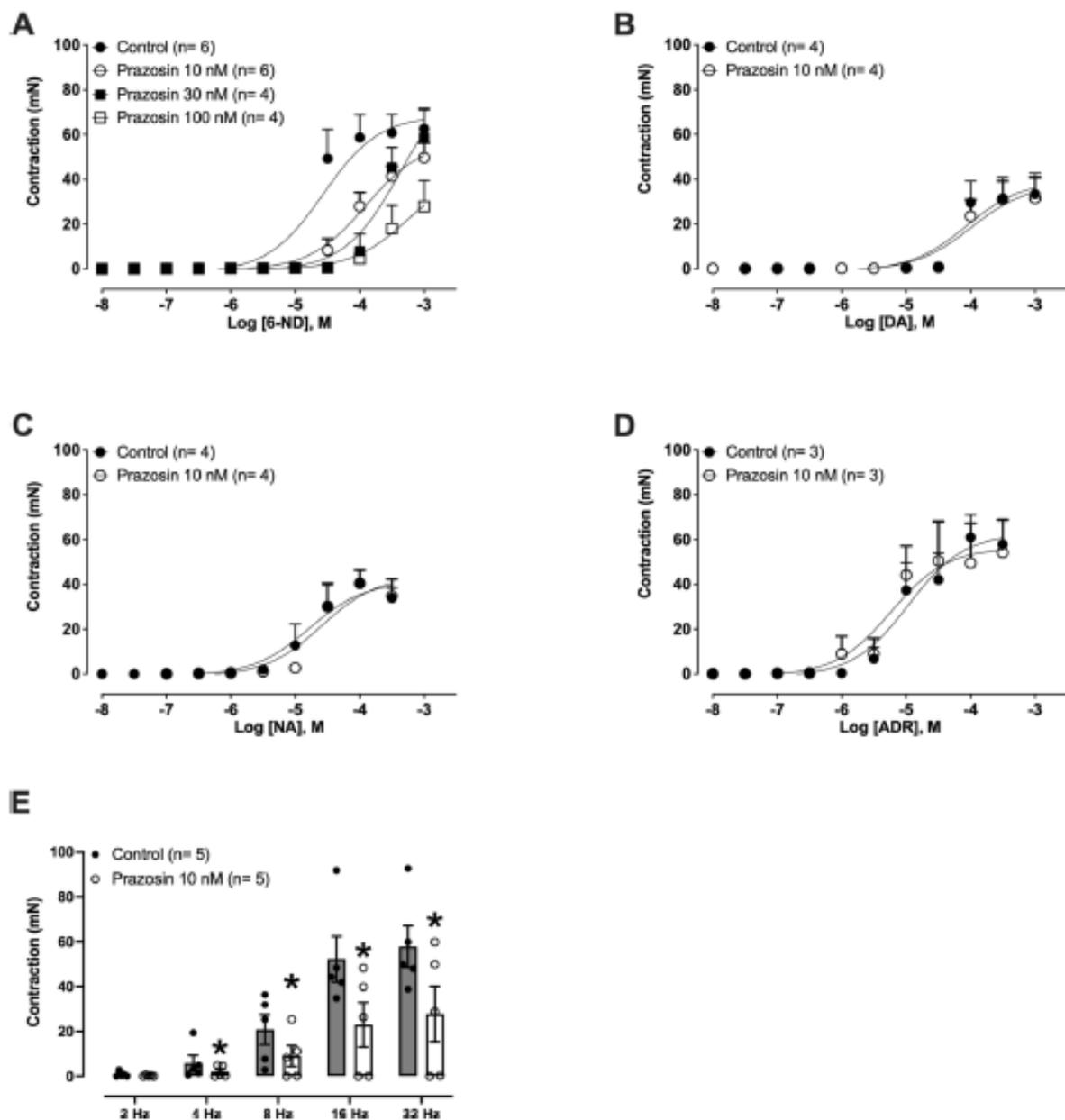
The  $pA_2$  values of the antagonists were calculated from application of the equation;  $pA_2 = \log(\text{antagonist concentration}) - \log(CR-1) - \log(\text{antagonist concentration})$ . The methods for determining both  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  were described elsewhere (Britto-Júnior et al. 2022a). Student's two-tail unpaired t-test was employed and the differences between groups. In addition, standard ANOVA, followed by the Newman-Keuls post-test, were used when more than two groups were involved. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant. The distribution of the log values ( $pEC_{50}$ ) was normal for each agonist, confirmed by the Shapiro-Wilk test (Motulsky 2014).

## Results

### Effect of doxazosin

Cumulative addition of 6-ND ( $10^{-8}$  to  $10^{-3}$  M; Fig. 1A), dopamine ( $10^{-8}$  to  $10^{-3}$  M; Fig. 1B), noradrenaline ( $10^{-8}$  to  $3 \times 10^{-4}$  M; Fig. 1C) and adrenaline ( $10^{-8}$  to  $3 \times 10^{-4}$  M; Fig. 1D) produced concentration-dependent contractions in the HEVD strips (Fig. 1A). The in vitro pretreatment (30 min) of the HEVD with doxazosin (0.1–1 nM) significantly reduced the  $E_{max}$  values to 6-ND with a  $pA_2$  value of  $10.38 \pm 0.20$  (*n* = 6). However, doxazosin (0.1 nM) did not affect  $E_{max}$  and  $pEC_{50}$  the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 1B), noradrenaline (Fig. 1C) and adrenaline (Fig. 1D). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and doxazosin-treated preparations are shown in Table 1.

Electrical-field stimulation (EFS; 2–32 Hz) evoked frequency-dependent contractile responses in the HEVD strips (Fig. 1E), which were significantly reduced by doxazosin (0.1 nM) in all frequencies tested ( $p = 0.0001$ ; *n* = 6; Fig. 1E).



**Fig. 3** Effect of prazosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Prazosin (10–30 nM) caused concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Prazosin (10 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine

(DA, Panel B), noradrenaline (NA, Panel C) and adrenaline (ADR, Panel D). Prazosin (10 nM; Panel E) caused significant inhibition of EFS-induced contractions of the HEVD. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

**Table 3** The effect of prazosin on the potency ( $pEC_{50}$ ) and maximal responses ( $E_{max}$ ) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA) in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	$pEC_{50}$ (log[M])	$E_{max}$ (mN)	<i>n</i>
6-ND	4.62 ± 0.11	62.55 ± 8.31	6
+ prazosin 10 nM	4.08 ± 0.25*	49.64 ± 6.67	6
+ prazosin 30 nM	3.47 ± 0.30*	58.42 ± 13.26	4
+ prazosin 100 nM	3.12 ± 1.24*	27.89 ± 11.66*	4
DA	4.62 ± 0.05	33.42 ± 9.26	4
+ prazosin 10 nM	4.55 ± 0.10	31.39 ± 9.44	4
NA	4.73 ± 0.34	32.25 ± 4.9	4
+ prazosin 10 nM	4.68 ± 0.22	34.79 ± 7.55	4
ADR	5.14 ± 0.29	57.76 ± 11.25	3
+ prazosin 10 nM	5.19 ± 0.33	54.14 ± 14.53	3

$pEC_{50}$  is defined as the negative logarithm of the  $EC_{50}$ .  $E_{max}$  is the maximal effect at the highest drug concentration. The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  were expressed as mean ± SEM. *n* means the number of vas deferens strips. \* $P < 0.05$  compared with respective control values

### Effect of tamsulosin

Pre-treatment (30 min) of the HEVD with tamsulosin (1 and 10 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to 6-ND (Fig. 2A) with a  $pA_2$  value of  $9.63 \pm 0.06$  ( $n = 5$ ). At 10 nM, tamsulosin nearly abolished the 6-ND-induced contractions (Fig. 2A). Tamsulosin (1 nM) did not affect the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 2B), noradrenaline (Fig. 2C) and adrenaline (Fig. 2D). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and tamsulosin-treated preparations are shown in Table 2.

Tamsulosin (1 nM) caused marked reductions ( $p = 0.0002$ ) in the HEVD contractions induced by EFS (2–32 Hz; Fig. 2E).

### Effect of prazosin

Pre-treatment (30 min) of the HEVD with prazosin (10–100 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to 6-ND (Fig. 3A) with a  $pA_2$  value of  $8.23 \pm 0.52$  ( $n = 6$ ). At 100 nM, prazosin markedly reduced the maximal responses to 6-ND (Fig. 3A). Prazosin (10 nM) did not affect the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 3B), noradrenaline (Fig. 3C) and adrenaline (Fig. 3D). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and prazosin-treated preparations are shown in Table 3.

Prazosin (10 nM) caused significant reductions ( $p = 0.0042$ ) in the HEVD contractions induced by EFS (2–32 Hz; Fig. 3E).

### Effect of silodosin

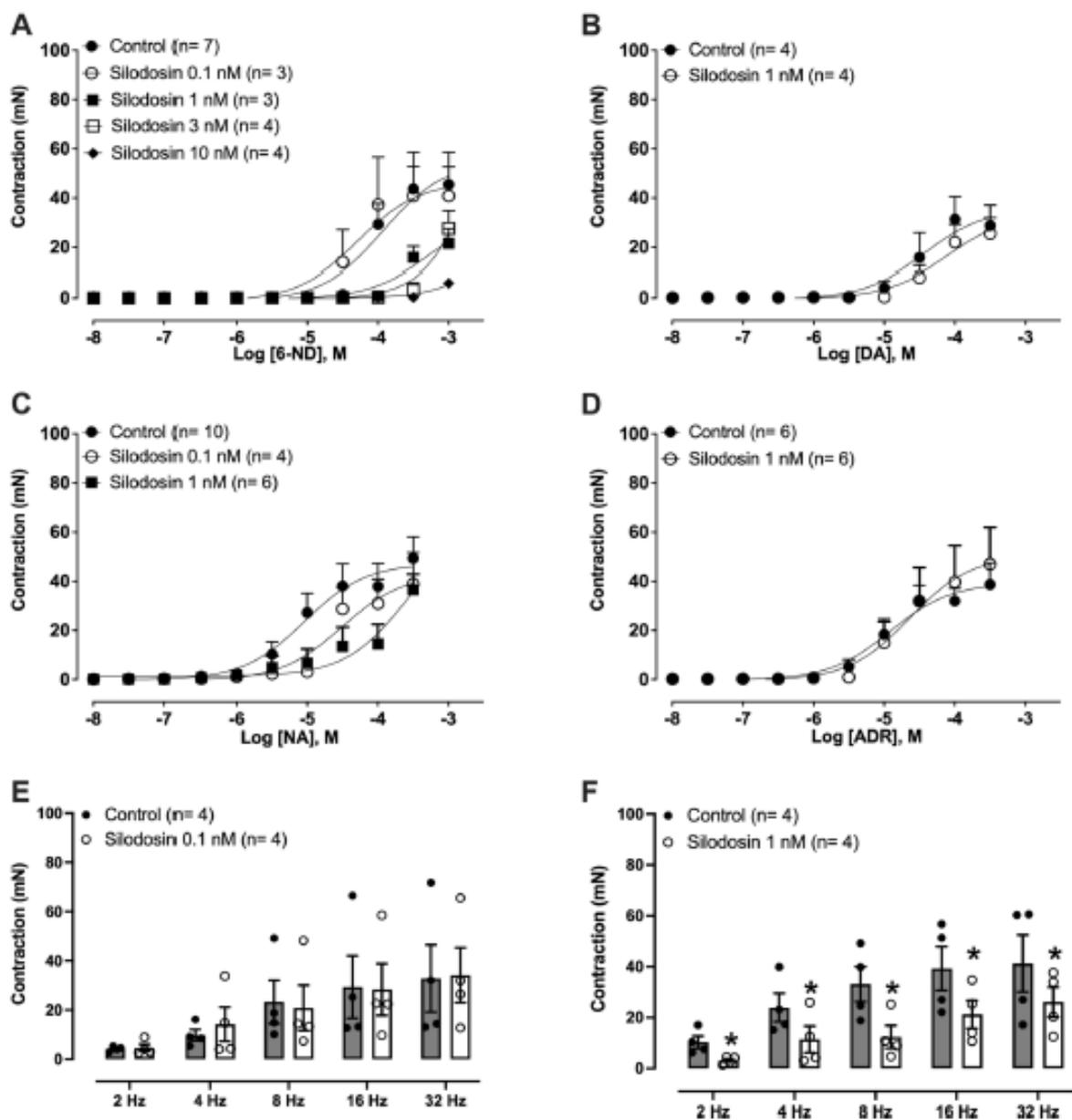
Pre-treatment of the HEVD with silodosin (1–10 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to 6-ND (Fig. 4A) with a  $pA_2$  value of  $9.84 \pm 0.06$  ( $n = 3$ ). At 10 nM, silodosin almost abolished the contractions induced by 6-ND (Fig. 4A). Silodosin (1 nM) did not affect the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 4B) and adrenaline (Fig. 4D). Silodosin (0.1 and 1 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to noradrenaline (Fig. 4C) with a  $pA_2$  value of  $10.71 \pm 0.12$  ( $n = 6$ ). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and silodosin-treated preparations are shown in Table 4.

Silodosin (0.1 nM) did not affect the EFS-induced HEVD contractions (Fig. 4E). However, at 1 nM, silodosin caused significant reductions in the HEVD contractions induced by EFS (Fig. 4F).

### Discussion

Incidence of abnormal ejaculation is a typical adverse reaction of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists (Michel 2007). This class of drugs induces relaxations of prostate, urethra and bladder neck smooth muscle (Andersson 2000), reducing the resistance of the prostatic urethra and bladder neck to the ejaculate coming from the vas deferens, thus allowing retrograde ejaculation to occur (van Dijk et al. 2006). However, in healthy volunteers treated for 5 days with either tamsulosin or alfuzosin, few individuals (95%) had increased post-ejaculate in the urine, indicating that  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists may cause anejaculation rather than retrograde ejaculation (Hellstrom et al. 2005); Thus, evaluation of the effect of these compounds in human vas deferens and seminal vesicles may provide useful information on the mechanism(s) involved.

Silodosin (KMD-3213; Shibata et al. 1995) has an increased affinity to adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  (0.039 nM) compared to  $\alpha_{1B}$  (6.5 nM) and  $\alpha_{1D}$  (2.2 nM; Tatemichi et al. 2006) in the lower urinary tract. In comparison to the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists alfuzosin (Ramsay et al. 1988), doxazosin (Elliott et al. 1982; Wilt and MacDonald 2006), tamsulosin (Lepor et al. 1988; Dunn et al. 2002), terazosin (Frishman et al. 1988; O'Leary 2001), and prazosin



**Fig. 4** Effect of silodosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Silodosin (1–10 nM) caused concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Silodosin (1 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine (DA, Panel B) and adrenaline (ADR, Panel D), but caused concen-

tration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to noradrenaline (NA, Panel C). Silodosin (0.1 nM) significantly reduced the EFS-induced contractions at 1 nM (Panel F), but not at 0.1 nM (1 nM; Panel E). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

**Table 4** The effect of silodosin on the potency ( $pEC_{50}$ ) and the maximum response ( $E_{max}$ ) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA), in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	$pEC_{50}$ (log[M])	$E_{max}$ (mN)	$n$
6-ND	$3.93 \pm 0.16$	$45.43 \pm 7.38$	7
+ silodosin 0.1 nM	$4.15 \pm 0.12$	$40.81 \pm 17.69$	3
+ silodosin 1 nM	$3.19 \pm 0.13^*$	$21.57 \pm 5.94^*$	3
+ silodosin 3 nM	-	$27.53 \pm 7.26^*$	4
+ silodosin 10 nM	-	$6.02 \pm 1.18^*$	4
DA	$4.35 \pm 0.23$	$28.71 \pm 8.33$	4
+ silodosin 1 nM	$4.09 \pm 0.32$	$25.50 \pm 6.44$	4
NA	$5.04 \pm 0.17$	$49.37 \pm 8.6$	10
+ silodosin 0.1 nM	$4.51 \pm 0.22^*$	$38.82 \pm 12.96$	4
+ silodosin 1 nM	$3.56 \pm 0.35^*$	$36.56 \pm 6.33$	6
ADR	$4.92 \pm 0.15$	$38.68 \pm 8.83$	6
+ silodosin 1 nM	$4.63 \pm 0.25$	$46.98 \pm 14.90$	6

$pEC_{50}$  is defined as the negative logarithm of the  $EC_{50}$ .  $E_{max}$  is the maximal effect at the highest drug concentration. The  $pEC_{50}$ ,  $E_{max}$  and the mean shifts were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n$  means the number of vas deferens strips). - means that it was not possible to calculate the  $pEC_{50}$ , since at this concentration, the antagonist abolished the contractions induced by 6-ND.  $^*P < 0.05$  compared with respective control values

**Table 5** Reported values for the inhibitor constant ( $K_i$ ) in nM of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists

	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1D}$	Reference
Doxazosin	1.99	0.72	1.66	Hatano et al. 1996
Tamsulosin	0.19	2.00	0.20	Chiu et al. 2007
Prazosin	0.62	0.61	0.38	Vicentic et al. 2002
Silodosin	0.04	6.50	2.20	Ramsay et al. 1988

(U'Prichard et al. 1978), silodosin was the most potent antagonist on the contractions induced by noradrenaline in the rat epididymal vas deferens (Britto-Júnior et al. 2022b). As shown here, silodosin was also more potent than tamsulosin, doxazosin and prazosin to inhibit noradrenaline-induced HEVD contractions. Interestingly, silodosin was the only  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist that was more potent to inhibit HEVD contractions induced by noradrenaline, as compared to those induced by 6-ND. Since tamsulosin and silodosin are the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists more associated with abnormal ejaculation (Cui et al. 2012), selectivity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor subtype could be the mechanism involved in this adverse reaction. Indeed,

incidence of abnormal ejaculation in patients treated with prazosin is rare, and in the rat isolated vas deferens, prazosin presents low potency on  $\alpha_{1A}$ - and high potency at  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor (Docherty 2013). The reported  $K_i$  values for the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists doxazosin, tamsulosin, prazosin, and silodosin, are described in Table 5.

6-Nitrodopamine concentration-dependently contracts both rat (Britto-Júnior et al. 2021b) and human (Britto-Júnior et al. 2022a) vas deferens, but more importantly, potentiates the contractile action of the dopamine, noradrenaline, and adrenaline in rat epididymal vas deferens at a very low concentration such as 10 pM (Britto-Júnior et al. 2023a). Although this mechanism is not clear, the potentiation is abolished when the vas deferens is pre-treated with the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin, suggesting that may be due to activation of adrenergic terminals (Britto-Júnior et al. 2023a). A similar potentiation of 6-ND on the increased atrial frequency induced by dopamine, noradrenaline and adrenaline was observed in the rat isolated atria (Britto-Júnior et al. 2023b). The blockade of  $\alpha_{1A}$  adrenoceptors in the rat vas deferens could lead to infertility (Michel 2007); however, in  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype-selective knockout mice ( $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor knockout), the contractions of the vas deferens induced by electric-field stimulation was reduced by 60–70%, but not abolished (Sanbe et al. 2007), indicating the presence of another receptor responsible for the observed contractions. This receptor could be the *hypothetical* 6-ND receptor. Our finding that silodosin, at a concentration (100 pM) that caused marked reductions in noradrenaline-induced contractions, did not affect the contractions induced by EFS, reinforces the concept that 6-ND is a major modulator of human vas deferens contractility (Britto-Júnior et al. 2022a). Indeed, inhibition of the EFS-induced HEVD contractions was only observed when the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists were used at concentrations that inhibited those induced by 6-ND.

Inconsistencies in the interactions of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists and ejaculatory function have been observed in mouse, rat and human data (Michel 2007), and as summarized in Table 6, they are also present in the pharmacology of 6-ND in rat and human vas deferens. The remarkable synergism between 6-ND and the classical catecholamines (dopamine, noradrenaline, and adrenaline) has been described so far only on the rat epididymal vas deferens (Britto-Júnior et al. 2023a) and rat isolated right atrium (Britto-Júnior et al. 2023b). Thus, it would be important to confirm the synergism in HEVD.

**Table 6** Results obtained with 6-nitrodopamine (6-ND) in the rat and human vas deferens

	Rat	Ref	Human	Ref
6-ND release (ng/mL)	1.4 ± 0.4	Britto-Júnior et al. 2021b	1.9 ± 0.8	Britto-Júnior et al. 2022a
Noradrenaline (ng/mL)	0.4 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2021b	0.5 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2022a
Dopamine release (ng/mL)	below LOQ	Britto-Júnior et al. 2021b	0.3 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
Adrenaline release (ng/mL)	below LOQ	Britto-Júnior et al. 2021b	0.2 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
L-NAME on 6-ND release	reduced	Britto-Júnior et al. 2021b	reduced	Britto-Júnior et al. 2022a
6-ND contractile (pEC <sub>50</sub> )	5.2 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2023a	<b>4.6 ± 0.1</b>	this manuscript
TTX on EFS contraction	abolished	Lima et al. 2022	?	
L-NAME on EFS contraction	no effect	Britto-Júnior et al. 2021b	reduced	Britto-Júnior et al. 2022a
Potentiate s DA, NA and ADR	potentiation	Britto-Júnior et al. 2023a	?	
Tricyclic compounds (pA <sub>2</sub> ):				
Amitriptyline	7.7 ± 0.5	Britto-Júnior et al. 2021b	8.9 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
Desipramine	8.2 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2021b	9.5 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
Carbamazepine	7.7 ± 0.4	Britto-Júnior et al. 2021b	8.8 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
α <sub>1</sub> antagonists (pA <sub>2</sub> ):				
Doxazosin	9.1 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>10.3 ± 0.2</b>	this manuscript
Tamsulosin	9.7 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>9.3 ± 0.1</b>	this manuscript
Silodosin	8.8 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>9.8 ± 0.1</b>	this manuscript
Prazosin	7.7 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>8.2 ± 0.5</b>	this manuscript
β <sub>1</sub> - and β <sub>1</sub> /β <sub>2</sub> antagonists (pA <sub>2</sub> ):				
Atenolol	6.5 ± 0.5	Lima et al. 2022	?	
Betaxolol	6.9 ± 0.1	Lima et al. 2022	?	
metoprolol	6.7 ± 0.1	Lima et al. 2022	?	
propranolol	6.5 ± 0.3	Lima et al. 2022	?	
pindolol	5.7 ± 0.1	Lima et al. 2022	?	

LOQ limit of quantitation

Furthermore, purification and sequence of the 6-ND receptor from human vas deferens should help to deep our understanding on the physiological processes involved in the ejaculation.

## Conclusion

The α<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonists doxazosin, tamsulosin, prazosin and silodosin only block the contractions of human isolated vas deferens at concentrations that inhibit 6-ND induced contractions reinforcing the concept that this novel catecholamine acts as a major modulator of human vas deferens contractility.

**Author Contributions** Conceptualization: JBJ, GDN. Data curation: JBJ, GDN. Formal analysis: GDN. Funding acquisition: EA, GDN. Investigation: RABG, JBJ, ATL, DLO, GQJ, GAOS. Methodology: RABG, ATL. Project administration: GDN. Supervision: EA and GDN. Visualization: AF, EA, GDN. Writing – original draft: JBJ, GDN. The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

**Funding** Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2021/14414–8 (JBJ), 2021/13593–6 (ATL), 2022/08022–2 (GQJ), 2017/15175–1 (EA), 2019/16805–4 (GDN).

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 303,839/2019–8 (GDN).

**Data availability** The authors authorize the availability of any data used in this study.

## Declarations

**Ethical approval** The investigation followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo – ICB/USP (protocol number 4.468.508), and the patients were asked to sign an informed consent.

**Consent to participate** Not applicable.

**Consent to publish** The authors authorize the submission and publication of this article in *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.

**Competing Interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Alm P (1982) On the autonomic innervation of the human vas deferens. *Brain Res Bull* 9:673–677. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90172-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90172-1)
- Alwaal A, Breyer BN, Lue TF (2015) Normal male sexual function: emphasis on orgasm and ejaculation. *Fertil Steril* 104:1051–1060. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.033>
- Andersson KE (2000) Mode of action of alpha1-adrenoreceptor antagonists in the treatment of lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 85(Suppl 2):12–18. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00059.x>
- Baumgarten HG, Falck B, Holstein AF, Owman C, Owman T (1968) Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 90:81–95. <https://doi.org/10.1007/BF00496704>
- Britto-Júnior J, Coelho-Silva WC, Murari GF, Serpellone Nash CE, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2021a) 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci* 1(276):119425. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119425>
- Britto-Júnior J, Ximenes L, Ribeiro A, Fregonesi A, Campos R, Ricardo de Almeida Kiguti L, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2021b) 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *Eur J Pharmacol*. 15(911):174544. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>
- Britto-Júnior J, da Silva-Filho WP, Amorim AC, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, Fregonesi A, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022a) 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. *Andrology* 10:1540–1547. <https://doi.org/10.1111/andr.13263>
- Britto-Júnior J, Ribeiro A, Ximenes L, Lima AT, Jacintho FF, Fregonesi A, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022b) Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens. *Eur J Pharmacol* 15(915):174716. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174716>
- Britto-Júnior J, Lima AT, Campos R, Gião AA, Mendes GD, Ferreira-Novais Silva LP, Fregonesi A, Pupo AS, Antunes E, De Nucci G (2023a) 6-Nitrodopamine potentiates contractions of rat isolated vas deferens induced by noradrenaline, adrenaline, dopamine and electric field stimulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396:2555–2570. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02478-6>
- Britto-Júnior J, Lima AT, Fuguhara V, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G (2023b) Investigation on the positive chronotropic action of 6-nitrodopamine in the rat isolated atria. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396:1279–1290. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02394-9>
- Chiu G, Li S, Cai H, Connolly PJ, Peng S, Stauber K, Pulito V, Liu J, Middleton SA (2007) Aminocyclohexylsulfonamides: discovery of metabolically stable alpha(1a/1d)-selective adrenergic receptor antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms (BPH/LUTS). *Bioorg Med Chem Lett* 17(22):6123–6128. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.051>
- Cho HJ, Yoo TK (2014) Silodosin for the treatment of clinical benign prostatic hyperplasia: safety, efficacy, and patient acceptability. *Res Rep Urol* 26(6):113–119. <https://doi.org/10.2147/RRU.S41618>
- Cui Y, Zong H, Zhang Y (2012) The efficacy and safety of silodosin in treating BPH: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 44:1601–1609. <https://doi.org/10.1007/s11255-012-0261-6>
- Debruyne FM (2000) Alpha blockers: are all created equal? *Urology* 1;56(5 Suppl 1):20–2. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00744-5](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00744-5)
- Docherty JR (2013) Prazosin has low potency at  $\alpha$ 1A-adrenoceptors and high potency at  $\alpha$ 1D -adrenoceptors in rat vas deferens. *Auton Autacoid Pharmacol* 33(3–4):49–57. <https://doi.org/10.1111/aap.12015>
- Dunn CJ, Matheson A, Faulds DM (2002) Tamsulosin: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. *Drugs Aging* 19:135–161. <https://doi.org/10.2165/00002512-200219020-00004>
- Elliott HL, Meredith PA, Sumner DJ, McLean K, Reid JL (1982) A pharmacodynamic and pharmacokinetic assessment of a new alpha-adrenoceptor antagonist, doxazosin (UK33274) in normotensive subjects. *Br J Clin Pharmacol* 13:699–703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1982.tb01439.x>
- Frishman WH, Eisen G, Lapsker J (1988) Terazosin: a new long-acting alpha 1-adrenergic antagonist for hypertension. *Med Clin North Am* 72:441–448. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30778-7](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30778-7)
- Gul M, Bocu K, Seretoglu EC (2022) Current and emerging treatment options for premature ejaculation. *Nat Rev Urol* 19:659–680. <https://doi.org/10.1038/s41585-022-00639-5>
- Hatano A, Tang R, Walden PD, Lepor H (1996) The alpha-adrenoceptor antagonist properties of the enantiomers of doxazosin in the human prostate. *Eur J Pharmacol* 313(1–2):135–143. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00502-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00502-x)
- Hellstrom WJ, Smith W, Sikka SC (2005) Effects of alpha-blockers on ejaculatory function in normal subjects [abstract]. *J Urol* 173(Suppl):874
- Kaleczyc J (1998) Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. *Microsc Res Tech* 42(6):409–422. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980915\)42:6<3c409::AID-JEMT4%3e3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<3c409::AID-JEMT4%3e3.0.CO;2-H)
- Lepor H, Baumann M, Shapiro E (1988) The stereospecificity of LY253352 for alpha 1-adrenoceptor binding sites in the brain and prostate. *Br J Pharmacol* 95:139–144. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb16557.x>
- Lima AT, Amorim AC, Britto-Júnior J, Campitelli RR, Fregonesi A, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022)  $\beta$ 1- and  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-adrenergic receptor antagonists block 6-nitrodopamine-induced contractions of the rat isolated epididymal vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 395(10):1257–1268. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02268-6>
- Michel MC (2007) Alpha1-adrenoceptors and ejaculatory function. *Br J Pharmacol* 152:289–290. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707369>
- Motulsky H (2014) Normality Tests. *Intuitive Biostatistics: A Non-mathematical Guide to Statistical Thinking*. Oxford University Press, New York, NY, pp 203–208
- O'Leary MP (2001) Tamsulosin: current clinical experience. *Urology* 58(6 Suppl 1):42–8. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)01346-2](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01346-2). (discussion 48)
- Oliveira LFG, Britto-Júnior J, Lima AT, Moraes MO, Moraes MEA, de Souza VB, Schenka AA, Zakia Monica F, De Nucci G (2023) Release of 6-nitrodopamine from human popliteal artery and vein. *Life Sci* 1(326):121801. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121801>
- Owman C, Sjostrand NO (1965) Short adrenergic neurons and catecholamine-containing cells in vas deferens and accessory male genital glands of different mammals. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 8(66):300–320. <https://doi.org/10.1007/BF00344342>
- Ramsay JW, Scott GI, Whitfield HN (1988) A double-blind controlled trial of a new alpha-1 blocking drug in the treatment of bladder outflow obstruction. *Br J Urol* 57:657–659. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1985.tb07026.x>
- Roehrborn CG, Schwinn DA (2004) Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign

- prostatic hyperplasia. *J Urol* 171:1029–1035. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000097026.43866.cc>
- Rogers MD, Kolettis PN (2013) Vasectomy. *Urol Clin North Am* 40:559–568
- Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Colacchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A (2007) Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol* 152:332–340. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707366>
- Shibata K, Foglar R, Horie K, Obika K, Sakamoto A, Ogawa S, Tsujimoto G (1995) KMD-3213, a novel, potent, alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist: characterization using recombinant human alpha 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol* 48:250–258
- Tatemichi S, Kobayashi K, Maezawa A, Kobayashi M, Yamazaki Y, Shibata N (2006) Alpha1-adrenoceptor subtype selectivity and organ specificity of silodosin (KMD-3213). *Yakugaku Zasshi* 126:209–216. <https://doi.org/10.1248/yakushi.126.209>. (Japanese)
- U'Prichard DC, Charness ME, Robertson D, Snyder SH (1978) Prazosin: differential affinities for two populations of alpha-noradrenergic receptor binding sites. *Eur J Pharmacol* 1(50):87–89. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90258-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90258-3)
- van Dijk MM, de la Rosette JJ, Michel MC (2006) Effects of alpha(1)-adrenoceptor antagonists on male sexual function. *Drugs* 66:287–301
- Vicentic A, Robeva A, Rogge G, Uberti M, Minneman KP (2002) Biochemistry and pharmacology of epitope-tagged alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1):58–65. <https://doi.org/10.1124/jpet.302.1.58>
- Walden PD, Gerardi C, Lepor H (1999) Localization and expression of the alpha1A-1, alpha1B and alpha1D-adrenoceptors in hyperplastic and non-hyperplastic human prostate. *J Urol* 161:635–640
- Wilt TJ, MacDonald R (2006) Doxazosin in the treatment of benign prostatic hypertrophy: an update. *Clin Interv Aging* 1:389–401. <https://doi.org/10.2147/cia.2006.1.4.389>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## 5 DISCUSSÃO

A ocorrência da ejaculação anormal é uma reação adversa possível e típica dos antagonistas dos receptores alfa1-adrenérgicos. É observado nessa classe de fármacos a indução do relaxamento da próstata, uretra e músculo liso do colo da bexiga, ocasionando uma redução a resistência da uretra prostática e do colo da bexiga à ejaculação proveniente do ducto deferente, gerando, dessa forma, a ocorrência da ejaculação retrógrada. Apesar disso, observado que em voluntários saudáveis tratados durante 5 dias com tansulosina ou alfuzosina, poucos indivíduos apresentaram aumento da urina pós-ejaculação, indicando que os antagonistas dos adrenoceptores alfa-1 podem causar anejaculação ao invés de ejaculação retrógrada. Dessa forma, a avaliação do efeito desses fármacos nos ductos deferentes e vesículas seminais humanos pode oferecer importantes dados sobre os possíveis mecanismos envolvidos. (99–102)

O fármaco silodosina apresenta uma afinidade aumentada ao adrenoceptor alfa-1A (0,039 nM) em comparação com alfa-1B (6,5 nM) e alfa-1D (2,2 nM) na parte inferior trato urinário. Comparando este fármaco com os outros antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos, como alfuzosina, doxazosina, tamsulosina, terazosina e prazosina, a silodosina foi o antagonista mais potente nas contrações induzidas pela noradrenalina no ducto deferente do epidídimo de rato. (103–112)

Como demonstrado neste trabalho, a silodosina também foi mais potente que a tansulosina, a doxazosina e a prazosina para inibir as contrações de DDEH induzidas pela noradrenalina. Ademais, a silodosina foi o único antagonista do adrenoceptor alfa-1 mais potente para inibir as contrações de DDEH induzidas pela noradrenalina, em comparação com aquelas induzidas pelo 6-ND. Estudo aponta que a tansulosina e a silodosina são os antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos mais associados à ejaculação anormal, indicando que a seletividade para o subtipo de receptores alfa-1A-adrenérgicos pode ser o mecanismo envolvido nesta reação adversa. (113)

Em observação, a incidência de ejaculação anormal em pacientes tratados com prazosina é rara, e nos ductos deferentes isolados de ratos, a prazosina apresenta baixa potência no alfa-1A- e alta potência no adrenoceptor

alfa-1D, podendo ser este o mecanismo envolvido. Os valores de  $K_i$  apresentados para os antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos doxazosin, tansulosina, prazosina e silodosina estão descritos na Tabela 5 do artigo publicado anexo em Resultados. (114)

Estudos desse grupo pesquisador apontaram que a concentração de 6-nitrodopamina contrai de forma dependente da concentração de ratos e humanos, os ductos deferentes, além de potencializar a ação contrátil da dopamina, noradrenalina e adrenalina nos ductos deferentes do epidídimo de ratos em uma concentração muito baixa. (97, 115–116)

Apesar do mecanismo demandar maior clareza, outro estudo desse grupo pesquisador observou que a potenciação é extinguida quando o ducto deferente é pré-tratado com o bloqueador dos canais de sódio dependente de voltagem tetrodotoxina, indicando que isso pode ser devido à ativação de terminais adrenérgicos. Uma potencialização semelhante do 6-ND no aumento da frequência atrial induzida por dopamina, noradrenalina e adrenalina foi indicada nos átrios isolados de ratos. (116–117)

O bloqueio dos adrenoceptores alfa-1A nos canais deferentes do rato pode levar à infertilidade, no entanto, em camundongos selecionados para os subtipos alfa-1-adrenérgico (alfa-1A, alfa-1B e alfa-1D), foi observado que as contrações dos ductos deferentes induzidas pela estimulação do campo elétrico foram reduzidas em 60-70%, mas não extintas, indicando a provável atuação de outro receptor. (99, 118)

Tal receptor poderia ser, hipoteticamente, o receptor 6-ND. A descoberta apresentada de que a silodosina, em uma concentração (100 pM), que causou reduções acentuadas nas contrações induzidas pela noradrenalina, não afetou as contrações induzidas pelo ECE, acaba por fortalecer a concepção de que o 6-ND é um importante modulador da contratilidade do ducto deferente humano. De fato, a inibição das contrações de DDEH induzidas por ECE só foi notada quando os antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos foram utilizados em concentrações que inibiram aquelas induzidas por 6-ND. (97)

Incongruências nas interações dos antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos e na função ejaculatória foram notadas em dados de

camundongos, ratos e humanos, e, conforme resumido na Tabela 6 deste trabalho no tópico Resultados, estão também presentes na relação farmacológica do 6-ND em ratos e ducto deferente humano. O claro sinergismo entre 6-ND e as catecolaminas clássicas (dopamina, noradrenalina e adrenalina) estava descrito até agora apenas nos ductos deferentes do epidídimo de ratos e no átrio direito isolado de ratos. Dessa forma, se torna de grande relevância confirmar o sinergismo no DDEH. No mais, a purificação e sequenciação do receptor 6-ND do ducto deferente humano contribui para o melhor entendimento sobre os processos fisiológicos relacionados a ejaculação. (99, 116–117).

## **6 CONCLUSÃO**

A classe de fármacos antagonistas dos receptores alfa-1-adrenérgicos, como doxazosina, tamsulosina, prazosina e silodosina apenas bloqueiam as contrações dos ductos deferentes humanos isolados em concentrações que inibem as contrações induzidas por 6-ND, respaldando a concepção de que esta catecolamina recém-descoberta tem ação como um modulador importante da contratilidade dos ductos deferentes humanos.

## REFERÊNCIAS

1. Alexopoulos GS. Mechanisms and treatment of late-life depression. *Transl Psychiatry*. 5 de agosto de 2019;9(1):1–16.
2. Lakatta EG. Catecholamines and cardiovascular function in aging. *Endocrinol Metab Clin North Am*. dezembro de 1987;16(4):877–91.
3. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*. 1971;40:465–500.
4. Brooks DJ. Functional imaging studies on dopamine and motor control. *J Neural Transm*. 1º de novembro de 2001;108(11):1283–98.
5. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. 1º de maio de 2000;43(5):533–49.
6. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev*. setembro de 2004;56(3):331–49.
7. Nagatsu T. Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci Res*. outubro de 1991;12(2):315–45.
8. Smeets WJ, González A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev*. setembro de 2000;33(2–3):308–79.
9. Gainetdinov RR, Caron MG. Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:261–84.
10. Richter D. CCXLIX. ADRENALINE AND AMINE OXIDASE.
11. Gilsbach R, Hein L. Are the pharmacology and physiology of  $\alpha_2$  adrenoceptors determined by  $\alpha_2$ -heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br J Pharmacol*. janeiro de 2012;165(1):90–102.
12. Kopin IJ, Rundqvist B, Friberg P, Lenders J, Goldstein DS, Eisenhofer G. Different relationships of spillover to release of norepinephrine in human heart,

kidneys, and forearm. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1º de julho de 1998;275(1):R165–73.

13. Black JW. Ahlquist and the development of beta-adrenoceptor antagonists. *Postgrad Med J*. 1976;52 Suppl 4:11–3.

14. Ahlquist RP. A STUDY OF THE ADRENOTROPIC RECEPTORS. *Am J Physiol-Leg Content*. 1º de junho de 1948;153(3):586–600.

15. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1º de junho de 1994;46(2):121–36.

16. Hieble JP, Bondinell WE, Ruffolo RR. Alpha- and beta-adrenoceptors: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J Med Chem*. 1º de setembro de 1995;38(18):3415–44.

17. Carlsson A. Detection and assay of dopamine. *Pharmacol Rev*. junho de 1959;11(2, Part 2):300–4.

18. Costa KM, Schoenbaum G. Dopamine. *Curr Biol*. 8 de agosto de 2022;32(15):R817–24.

19. Hornykiewicz O. The Action of Dopamine on the Arterial Blood Pressure of the Guinea-Pig. *Br J Pharmacol Chemother*. 1958;13(1):91–4.

20. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci Lond Engl* 1979. junho de 2007;112(12):583–97.

21. Holtz P, Credner K, Strübing C. Dopahyperglykämie. 1º de janeiro de 1944;280(1–2):9–15.

22. Hornykiewicz O. [Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man]. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 7 de setembro de 1962;87:1807–10.

23. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. Sibley DR, organizador. *Pharmacol Rev*. março de 2011;63(1):182–217.

24. Sibley DR, Monsma FJ. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* janeiro de 1992;13:61–9.
25. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent | SpringerLink [Internet]. [citado 21 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-001-0111-9>
26. Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. Em: Riederer P, Reichmann H, Youdim MBH, Gerlach M, organizadores. *Parkinson's Disease and Related Disorders*. Vienna: Springer; 2006. p. 9–15. (*Journal of Neural Transmission. Supplementa*).
27. Tsunoda M, Uchino E, Imai K, Hayakawa K, Funatsu T. Determination of nitrocatecholamines in rat brain using high-performance liquid chromatography-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. *J Chromatogr A.* 14 de setembro de 2007;1164(1–2):162–6.
28. Chiari A, Li XH, Xu Z, Pan HL, Eisenach JC. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. *Neuroscience.* 2000;101(1):189–96.
29. Shintani F, Kinoshita T, Kanba S, Ishikawa T, Suzuki E, Sasakawa N, et al. Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain. *J Biol Chem.* 7 de junho de 1996;271(23):13561–5.
30. Britto-Júnior J, Jacintho FF, Figueiredo Murari GM, Campos R, Moreno RA, Antunes E, et al. Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. *Life Sci.* fevereiro de 2020;243:117257.
31. Campos R, Pinheiro DHA, Britto-Júnior J, de Castro HA, Mendes GD, Moraes MO, et al. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from *Chelonoidis carbonaria aortae* in vitro. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 22 de março de 2021;1173:122668.
32. Britto-Júnior J, Pinheiro DHA, Justo AFO, Figueiredo Murari GM, Campos R, Mariano FV, et al. Endothelium-derived dopamine modulates EFS-

induced contractions of human umbilical vessels. *Pharmacol Res Perspect.* agosto de 2020;8(4):e00612.

33. Britto-Júnior J, Fernandes Jacintho F, Campos R, Pinheiro DHA, Figueiredo Murari GM, de Souza VB, et al. The basal release of endothelium-derived catecholamines regulates the contractions of *Chelonoidis carbonaria* aorta caused by electrical-field stimulation. *Biol Open.* 20 de janeiro de 2021;10(1):bio057042.

34. Lima AT, Dos Santos EX, Britto-Júnior J, De Souza VB, Schenka AA, Campos R, et al. Release of 6-nitrodopamine modulates vascular reactivity of *Pantherophis guttatus* aortic rings. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* dezembro de 2022;262:109471.

35. Britto-Júnior J, De Oliveira MG, Dos Reis Gati C, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, et al. 6-NitroDopamine is an endogenous modulator of rat heart chronotropism. *Life Sci.* outubro de 2022;307:120879.

36. Britto-Júnior J, Pereira Do Prado GL, Chiavegatto S, Cunha F, Moraes MO, Elisabete A. Moraes M, et al. The importance of the endothelial nitric oxide synthase on the release of 6-nitrodopamine from mouse isolated atria and ventricles and their role on chronotropism. *Nitric Oxide.* setembro de 2023;138–139:26–33.

37. De Oliveira LFG, Britto-Júnior J, Lima AT, Moraes MO, Moraes MEA, De Souza VB, et al. Release of 6-nitrodopamine from human popliteal artery and vein. *Life Sci.* agosto de 2023;326:121801.

38. Koslov DS, Andersson KE. Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens—an update. *Front. Pharmacol., Sec. Integrative and Regenerative Pharmacology.* agosto 2013; 1663-9812.

39. Steers WD. Physiology of the vas deferens. *World J Urol.* 1994;12(5):281-5.

40. Dixon JS, Jen PYP, Gosling JA. Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: A review. *Microsc. Res. Tech.* 1998, 42: 423-432.

41. Kaleczyc J. Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. *Microsc. Res. Tech.* 1998. 42, 409–422.
42. Westfall TD, Westfall, DP. Pharmacological techniques for the in vitro study of the vas deferens. *J. Pharmacol. Toxicol.* 2001. *Methods* 45, 109–122.
43. Burnstock G, Verkhatsky A. Vas deferens—a model used to establish sympathetic cotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.* 2010. 31, 131–139.
44. Elbadawi A, Goodman DC. Autonomic innervation of the accessory male genital glands, in *Male Accessory Sex Glands*, eds E. Spring-Mills and E. S. E. Hafez. New York, NY: Elsevier/North Holland, 1980. 101–128.
45. Kaleczyc J. Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. *Microsc. Res. Tech.* 1998. 42, 409–422.
46. Kihara K, Sato K, Oshima H. Sympathetic efferent pathways projecting to the vas deferens. *Microsc. Res. Tech.* 1998. 42, 398–408.
47. Waldinger MD, Berendsen HHG, Blok BFM, Olivier B, Holstege G. Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: the involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res.* maio de 1998;92(2):111–8.
48. Waldinger MD, Zwinderman AH, Olivier B. On-demand treatment of premature ejaculation with clomipramine and paroxetine: a randomized, double-blind fixed-dose study with stopwatch assessment. *Eur Urol.* outubro de 2004;46(4):510–5; discussion 516.
49. Mason MM, Schuppe K, Weber A, Gurayah A, Muthigi A, Ramasamy R. Ejaculation: the Process and Characteristics From Start to Finish. *Curr Sex Health Rep.* 14 de setembro de 2022;15(1):1–9.
50. Alwaal A, Breyer BN, Lue TF. Normal male sexual function: emphasis on orgasm and ejaculation. *Fertil Steril.* novembro de 2015;104(5):1051–60.
51. Giuliano F, Clément P. Physiology of Ejaculation: Emphasis on Serotonergic Control. *Eur Urol.* setembro de 2005;48(3):408–17.

52. Waldinger MD. THE NEUROBIOLOGICAL APPROACH TO PREMATURE EJACULATION.
53. Clement, P. and Giuliano, F. (2016), Physiology and Pharmacology of Ejaculation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016. 119: 18-25
54. Wu EH, De Cicco FL. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Male Genitourinary Tract. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 17 de agosto de 2023]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562291/>
55. Pereira-Lourenço M, Vieira e Brito D, Pereira BJ. Premature Ejaculation – From Physiology to Treatment. *J Fam Reprod Health* [Internet]. 25 de dezembro de 2019 [citado 21 de junho de 2023]; Disponível em: <https://publish.kne-publishing.com/index.php/JFRH/article/view/2125>
56. Ver Voort SM. Ejaculatory stimulation in spinal-cord injured men. *Urology*. 1º de março de 1987;29(3):282–9.
57. Brindley GS, Sauerwein D, Hendry WF. Hypogastric Plexus Stimulators for Obtaining Semen from Paraplegic Men. *Br J Urol*. julho de 1989;64(1):72–7.
58. Comarr AE. Sexual Function Among Patients with Spinal Cord Injury. *Urol Int*. 1970;25(2):134–68.
59. Ventura S, Burnstock G. Evidence against nitrergic neuromodulation in the rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*. 3 de setembro de 1997;334(1):87–93.
60. Warner TD, de Nucci G, Vane JR. Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. *Br J Pharmacol*. julho de 1989;97(3):777–82.
61. Bell C, Gillespie J s., Macrae I m. Release of noradrenaline and dopamine by nerve stimulation in the guinea-pig and rat vas deferens. *Br J Pharmacol*. 1984;81(3):563–9.
62. Celuch SM, Sloley BD. Regional distribution of dopamine, 5-hydroxytryptamine, and noradrenaline in the rat vas deferens. *Neurochem Res*. outubro de 1988;13(10):967–72.

63. Leedham JA, Pennefather JN. Dopamine acts at the same receptors as noradrenaline in the rat isolated vas deferens. *Br J Pharmacol.* outubro de 1982;77(2):293–9.
64. Bodelsson G, Stjernquist M. Characterization of contractile adrenoceptors in the human umbilical artery. *Eur J Pharmacol.* agosto de 1995;282(1–3):95–101.
65. Errasti AE, Velo MPR, Torres RM, Sardi SP, Rothlin RP. Characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein: Human umbilical vein  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol.* janeiro de 1999;126(2):437–42.
66. Terasaki T. Effects of autonomic drugs on intraluminal pressure and excretion of rat seminal vesicles in vivo. *Tohoku J Exp Med* 1989;157:373–9.
67. Kontani H, Shiraoya C. Method for simultaneous recording of the prostatic contractile and urethral pressure responses in anesthetized rats and the effects of tamsulosin. *Jpn J Pharmacol* 2002;90:281–90.
68. Sjostrand NO, Hammarstrom M. Sympathetic regulation of fructose secretion in the seminal vesicle of the guinea-pig. *Acta Physiol Scand* 1995;153:189–202.
69. Sjostrand NO, Ehren I, Eldh J, Wiklund NP. NADPH-diaphorase in glandular cells and nerves and its relation to acetylcholinesterase-positive nerves in the male reproductive tract of man and guinea-pig. *Urol Res* 1998;26:181–8.
70. Uckert S, Bazrafshan S, Sonnenberg JE, Kuczyk MA. Effects of phosphodiesterase inhibitors on the contractile responses of isolated human seminal vesicle tissue to adrenergic stimulation. *J Sex Med* 2009;6:408–14.
71. Filippi S, Vannelli GB, Granchi S, Luconi M, Crescioli C, Mancina R et al. Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193:89–100. 23

72. Carmichael MS, Humbert R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:27–31.
73. Banks FCL, Knight GE, Calvert RC, Turmaine M, Thompson CS, Mikhailidis DP et al. Smooth muscle and purinergic contraction of the human, rabbit, rat, and mouse testicular capsule. *Bio Reprod* 2006;74:437–80.
74. Kim SW, Paick JS. Peripheral effects of serotonin on the contractile responses of rat seminal vesicles and vasa deferentia. *J Androl* 2004;25:893–9. 27
75. Ishigami T, Yoshioka K, Karicheti V, Marson L. A role for peripheral 5-HT<sub>2</sub> receptors in serotonin-induced facilitation of the expulsion phase of ejaculation in male rats. *J Sex Med* 2013;10:2688–702.
76. Xia JD, Han YF, Zhou LH, Chen Y, Dai YT. Efficacy and safety of local anaesthetics for premature ejaculation: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl* 2013;15:497–502
77. Denys P, Mane M, Azouvi P, Chartier-Kastler E, Thiebaut JB, Bussel B. Side effects of chronic intrathecal baclofen on erection and ejaculation in patients with spinal cord lesions. *Arch Phys Med Rehabil* 1998;79:494–6
78. Borgdorff AJ, Bernabe J, Denys P, Alexandre L, Giuliano F. Ejaculation elicited by microstimulation of lumbar spinothalamic neurons. *Eur Urol* 2008;54:449–56
79. Tang Y, Rampin O, Calas A, Facchinetti P, Giuliano F. Oxytocinergic and serotonergic innervation of identified lumbosacral nuclei controlling penile erection in the male rat. *Neuroscience* 1998;82:241–54
80. Clement P, Bernabe J, Compagnie S, Alexandre L, McCallum S, Giuliano F. Inhibition of ejaculation by the non-peptide oxytocin receptor antagonist GSK557296: a multi-level site of action. *Br J Pharmacol* 2013;169:1477–85.
81. Bowker RM, Westlund KN, Sullivan MC, Coulter JD. Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. *Prog Brain Res* 1982;57:239–65.

82. Giuliano F, Clement P. Pharmacology for the treatment of premature ejaculation. *Pharmacol Rev* 2012;64:621–44.
83. Truitt WA, Coolen LM. Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 2002;297:1566–9.
84. Clement P, Peeters M, Bernabe J, Laurin M, Alexandre L, Giuliano F. Role of the neurokinin-1 receptors in ejaculation in anesthetized rats. *J Sex Med* 2009;6:126–34
85. Clement P, Laurin M, Compagnie S, Facchinetti P, Bernabe J, Alexandre L et al. Effect of dapoxetine on ejaculatory performance and related brain neuronal activity in rapid ejaculator rats. *J Sex Med* 2012;9:2562–73.
86. Lorrain DS, Matuszewich L, Friedman RD, Hull EM. Extracellular serotonin in the lateral hypothalamic area is increased during the postejaculatory interval and impairs copulation in male rats. *J Neurosci* 1997;17:9361–6.
87. Makarenko IG, Meguid MM, Ugrumov MV. Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT(1B)) receptors in the normal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 2002;328:155–9
88. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083–152.
89. Peeters M, Giuliano F. Central neurophysiology and dopaminergic control of ejaculation. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:438–53.
90. Clement P, Pozzato C, Heidbreder C, Alexandre L, Giuliano F, Melotto S. Delay of ejaculation induced by SB-277011, a selective dopamine D3 receptor antagonist, in the rat. *J Sex Med* 2009;6:980–8.
91. Greco E, Polonio-Balbi P, Speranza JC. Levosulpiride: a new solution for premature ejaculation? *Int J Impot Res* 2002;14:308–9.
92. Arletti R, Bazzani C, Castelli M, Bertolini A. Oxytocin improves male copulatory performance in rats. *Horm Behav* 1985;19:14–20.

93. de Jong TR, Veening JG, Olivier B, Waldinger MD. Oxytocin involvement in SSRI-induced delayed ejaculation: a review of animal studies. *J Sex Med* 2007;4:14–28.
94. Shinghal R, Barnes A, Mahar KM, Stier B, Giancaterino L, Condreay LD et al. Safety and efficacy of epelsiban in the treatment of men with premature ejaculation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose study. *J Sex Med* 2013;10:2506–17.
95. Kirby EW, Carson CC, Coward RM. Tramadol for the management of premature ejaculation: a timely systematic review. *Int J Impot Res* 2015;27:121–7.
96. Rogers MD, Kolettis PN (2013) Vasectomy. *Urol Clin North Am.* 40:559–568
97. Britto-Júnior J, da Silva-Filho WP, Amorim AC, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, Fregonesi A, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022a) 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. *Andrology* 10:1540–1547.
98. Motulsky, H., 2014. Normality Tests. In: *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 203–208.
99. Michel MC. Alpha1-adrenoceptors and ejaculatory function. *Br J Pharmacol.* 2007, 152:289-90. doi: 10.1038/sj.bjp.0707369.
100. Andersson KE. Mode of action of alpha1-adrenoreceptor antagonists in the treatment of lower urinary tract symptoms. *BJU Int.* 2000; 85 Suppl 2:12-8. doi: 10.1046/j.1464-410x.2000.00059.x.
101. van Dijk MM, de la Rosette JJ, Michel MC (2006). Effects of alpha(1)-adrenoceptor antagonists on male sexual function. *Drugs* 66: 287–301.
102. Hellstrom WJ, Smith W, Sikka SC. Effects of alpha-blockers on ejaculatory function in normal subjects [abstract]. *J Urol* 2005; 173 Suppl.: 874
103. Shibata K, Foglar R, Horie K, Obika K, Sakamoto A, Ogawa S, Tsujimoto G. KMD-3213, a novel, potent, alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist:

characterization using recombinant human alpha 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol.* 1995, 48:250-8.

104. Tatemichi S, Kobayashi K, Maezawa A, Kobayashi M, Yamazaki Y, Shibata N. [Alpha1-adrenoceptor subtype selectivity and organ specificity of silodosin (KMD-3213)]. *Yakugaku Zasshi.* 2006;12:209-16. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.126.209.

105. Ramsay, J.W., Scott, G.I., Whitfield, H.N., 1988 A double-blind controlled trial of a new alpha-1 blocking drug in the treatment of bladder outflow obstruction. *Br J Urol.* 57:657-9. doi: 10.1111/j.1464-410x.1985.tb07026.x.

106. Elliott H.L., Meredith P.A., Sumner D.J., McLean K., Reid J.L., 1982. A pharmacodynamic and pharmacokinetic assessment of a new alpha-adrenoceptor antagonist, doxazosin (UK33274) in normotensive subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 13:699-703. doi: 10.1111/j.1365-2125.1982.tb01439.x.

107. Wilt T.J., MacDonald R., Doxazosin in the treatment of benign prostatic hypertrophy: an update. *Clin Interv Aging.* 2006, 1:389-401. doi: 10.2147/cia.2006.1.4.389.

108. Lepor, H., Baumann, M., Shapiro, E., 1988. The stereospecificity of LY253352 for alpha 1-adrenoceptor binding sites in the brain and prostate. *Br J Pharmacol.* 95:139-44. doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb16557.x

109. Dunn C.J., Matheson A., Faulds D.M., 2002. Tamsulosin: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. *Drugs Aging.* 19:135-61. doi: 10.2165/00002512-200219020-00004

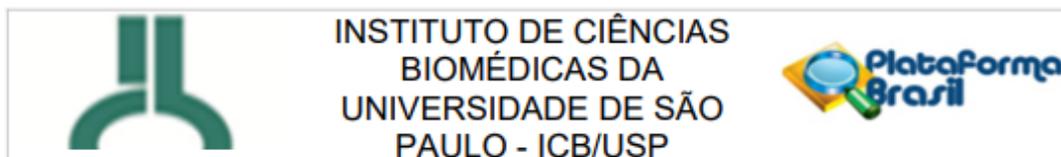
110. Frishman W.H., Eisen G., Lapsker J. 1988. Terazosin: a new long-acting alpha 1-adrenergic antagonist for hypertension. *Med Clin North Am.* 72:441-8. doi: 10.1016/s0025-7125(16)30778-7.

111. O'Leary M.P., 2001. Tamsulosin: current clinical experience. *Urology.* 58(6 Suppl 1):42-8; discussion 48. doi: 10.1016/s0090-4295(01)01346-2.

112. U'Prichard, D.C, Charness, M.E, Robertson, D., Snyder, S.H., 1978. Prazosin: differential affinities for two populations of alpha-noradrenergic receptor binding sites. *Eur J Pharmacol.* 1;50:87-9. doi: 10.1016/0014-2999(78)90258-3.
113. Cui Y, Zong H, Zhang Y. The efficacy and safety of silodosin in treating BPH: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol.* 2012;44:1601-9. doi: 10.1007/s11255-012-0261-6.
114. Docherty JR. Prazosin has low potency at  $\alpha$ 1A-adrenoceptors and high potency at  $\alpha$ 1D -adrenoceptors in rat vas deferens. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2013;33(3-4):49-57. doi: 10.1111/aap.12015.
115. Britto-Júnior J, Coelho-Silva WC, Murari GF, Serpellone Nash CE, Mónica FZ, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci.* 2021a; 1;276:119425. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119425.
116. Britto-Júnior J, Lima AT, Campos R, Gião AA, Mendes GD, Ferreira-Novaes Silva LP, Fregonesi A, Pupo AS, Antunes E, De Nucci G. 6-Nitrodopamine potentiates contractions of rat isolated vas deferens induced by noradrenaline, adrenaline, dopamine and electric field stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023a; 396:2555-2570. doi: 10.1007/s00210-023-02478-6.
117. Britto-Júnior J, Lima AT, Fuguhara V, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G. Investigation on the positive chronotropic action of 6-nitrodopamine in the rat isolated atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023b; 396:1279-1290. doi: 10.1007/s00210-023-02394-9.
118. Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol.* 2007;152:332-40. doi: 10.1038/sj.bjp.0707366.

## **APÊNDICES**

### **PARECER CONSUBSTANCIADO E INFORMAÇÕES BÁSICAS CEP**



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** GDN 020/20 - AVALIAÇÃO DO PAPEL FISIOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO DA 6-NITRODOPAMINA NO DUCTO DEFERENTE DE VOLUNTÁRIOS SUBMETIDOS A VASECTOMIA

**Pesquisador:** GILBERTO DE NUCCI

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 40231320.9.0000.5467

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.467.902

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise de emenda ao projeto "AVALIAÇÃO DO PAPEL FISIOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO DA 6-NITRODOPAMINA NO DUCTO DEFERENTE DE VOLUNTÁRIOS SUBMETIDOS A VASECTOMIA"

Pesquisador Responsável: GILBERTO DE NUCCI

02020\_carta\_emenda02.pdf, postada em 26/09/2023: "Durante a condução do estudo, houve a participação dos alunos Renan Arthur Bosio Guimaraes, WALTER PINTO DA SILVA FILHO e da professora Fabiola Taufic Mônica Iglesias. Os alunos tiveram participação na coleta do material na unidade hospitalar e transporte para o laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), onde participaram das análises in vitro das substâncias descritas nesse protocolo. A professora Fabiola colaborou nas orientações/supervisões das análises in vitro no laboratório e

farmacologia da UNICAMP. As inclusões acima estão atualizadas no protocolo emenda 2 e podem ser encontradas nas páginas 6 e 11. Foi adicionado no protocolo como equipe de pesquisa (Pesquisadores associados). As inclusões acima estão atualizadas no protocolo emenda 2 e podem ser encontradas nas páginas 6 e 11. As cartas de concordância dos pesquisadores adicionados estão anexadas na plataforma brasil. O restante do protocolo, como desenho do estudo, riscos-benefícios etc., mantém-se os mesmos em relação a versão anterior aprovada por esse Comitê."

**Endereço:** Av. Profº Lineu Prestes, 2415

**Bairro:** Cidade Universitária

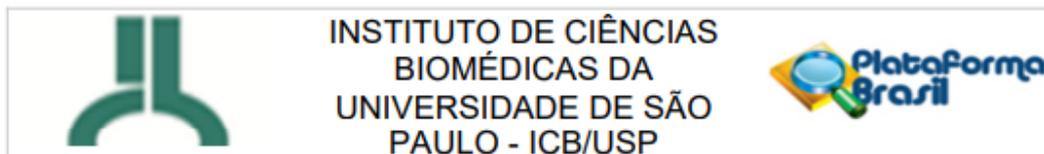
**CEP:** 05.508-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7733

**E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 6.467.902

O texto a seguir foi extraído de "INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2216818\_E2.pdf, postado em 19/10/2023.  
 Resumo: "Estudo científico em laboratório, de natureza básica, quantitativo, de procedimento experimental e com objetivo de estudo explicativo para avaliação das alterações da responsividade de ducto deferente em ensaios farmacológicos a fim de investigar as funções fisiológicas e fisiopatológicas da 6nitrodopamina."

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O texto a seguir foi extraído de "INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2216818\_E2.pdf, postado em 19/10/2023.  
 "Objetivo Primário: Avaliar os efeitos da 6-nitrodopamina sobre o tônus do ducto deferente, Avaliar a produção de catecolaminas e 6-nitrodopamina pelo ducto deferente humano.  
 Objetivo Secundário: Identificar e localizar enzimas envolvidas na síntese de catecolaminas (tirosina hidroxilase, dopamina beta-hidroxilase, dopa descarboxilase) no ducto deferente humano, Investigar o funcionamento de enzimas da via de síntese de catecolaminas em ducto deferente utilizando a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS)."  
 Critério de Inclusão: Participantes do sexo masculino com idade superior a 18 anos completos e inferior a 70 anos completos, que são legíveis a realização de vasectomia.

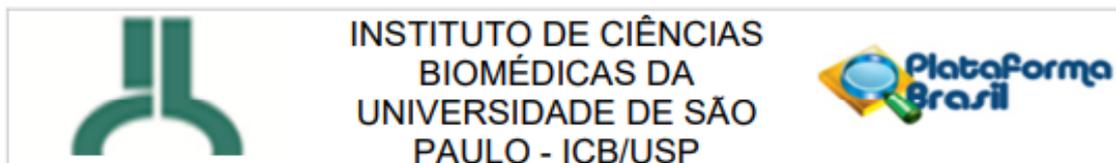
#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O texto a seguir foi extraído de "INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2216818\_E2.pdf, postado em 19/10/2023.  
 "Riscos: Não é previsto risco para esse estudo já que a equipe de pesquisa não terá contato com o participante. Pode haver algum risco de exposição dos dados do participante, porém o risco é mínimo tendo em vista que a equipe de pesquisa é pequena e estão em constante monitoramento.  
 Benefícios: Essa pesquisa não visa nenhum objetivo direto ao participante."

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto Unicêntrico, caráter acadêmico, comparativo de reatividade do ducto deferente a 6-nitrodopamina em banho isolado de órgãos e ensaios farmacológicos. Serão coletadas amostras (200) de material que iria para descarte. Não haverá intervenção direta com o participante.

<b>Endereço:</b> Av. Profº Lineu Prestes, 2415	<b>CEP:</b> 05.508-000
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO
<b>Telefone:</b> (11)3091-7733	<b>E-mail:</b> cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 6.467.902

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão adequados.

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências..."

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Solicita-se a inclusão de dois estudantes e de uma professora. A referida inclusão está bem justificada na emenda por isso recomenda-se a aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar a emenda ao projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2216818_E2.pdf	19/10/2023 14:44:14		Aceito
Outros	Form_submissao_Emendas_02020_260923.pdf	26/09/2023 15:18:21	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Outros	02020_carta_emenda02.pdf	26/09/2023 15:17:57	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02020_Ducto_Deferente_Protocolo_emenda02_260923.pdf	26/09/2023 15:17:36	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_FAB IOLA.pdf	26/09/2023 14:46:21	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_walter.pdf	26/09/2023 14:46:04	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_renata.pdf	26/09/2023 14:45:55	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Outros	indaiatuba_Anuencia_sig.pdf	24/02/2023 16:15:05	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
TCLE / Termos de	02020_TCLE_emenda01.pdf	24/02/2023	GILBERTO DE	Aceito

**Endereço:** Av. Profº Lineu Prestes, 2415

**Bairro:** Cidade Universitária

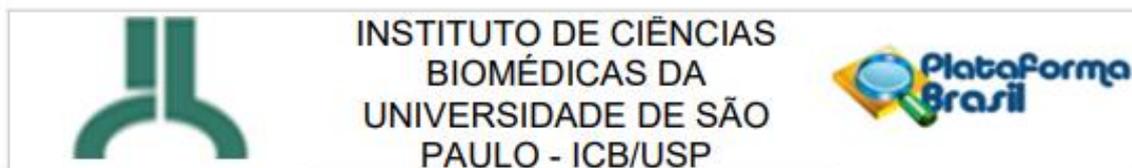
**UF:** SP

**Telefone:** (11)3091-7733

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 05.508-000

**E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 6.467.902

Assentimento / Justificativa de Ausência	02020_TCLE_emenda01.pdf	16:14:57	NUCCI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02020_Ducto_Deferente_Protocolo_eme nda01_301122.pdf	24/02/2023 16:05:21	GILBERTO DE NUCCI	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	12/11/2020 10:18:22	GILBERTO DE NUCCI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 27 de Outubro de 2023

---

**Assinado por:**  
**Camila Squarzoni Dale**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Profº Lineu Prestes, 2415

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 05.508-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7733

**E-mail:** cep@icb.usp.br



**Projeto de Pesquisa:**  
 AVALIAÇÃO DO PAPEL FISIOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO DA 6-NITRODOPAMINA NO DUCTO DEFERENTE DE VOLUNTÁRIOS  
 SUBMETIDOS A VASECTOMIA

**Informações Preliminares**

\_\_\_\_\_ **Responsável Principal** \_\_\_\_\_

CPF/Documento: 868.134.478-15	Nome: GILBERTO DE NUCCI
Telefone: 1932516928	E-mail: DENUCCI@GILBERTODENUCCI.COM

\_\_\_\_\_ **Instituição Proponente** \_\_\_\_\_

CNPJ:	Nome da Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP
-------	--

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas no Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional? Não

■ **Equipe de Pesquisa**

CPF/Documento	Nome
077.242.036-01	Renan Arthur Bosio Guimaraes
052.875.994-98	LUIZ EDUARDO CALOETE XIMENES
032.170.641-27	JOSE BRITTO JUNIOR
373.940.168-03	WALTER PINTO DA SILVA FILHO
219.644.718-85	Fabiola Taufic Mônica Iglesias
441.662.098-50	GUILHERME MACHADO DE FIGUEIREDO MURARI

**Área de Estudo**

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Clínico

Título Público da Pesquisa: GDN 020/20 - AVALIAÇÃO DO PAPEL FISIOLÓGICO E FISIOPATOLÓGICO DA 6-NITRODOPAMINA NO DUCTO DEFERENTE DE VOLUNTÁRIOS SUBMETIDOS A VASECTOMIA

Expansão do Acrônimo do Público: Ducto Deferente

\_\_\_\_\_ **Contato Público** \_\_\_\_\_

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
868.134.478-15	GILBERTO DE NUCCI	1932516928	DENUCCI@GILBERTODENUCCI.COM

Contato Científico: GILBERTO DE NUCCI

**Desenho de Estudo / Apoio Financeiro**

Desenho do Estudo: Intervenção/Experimental

**Condições de saúde ou problemas**

Condição de saúde ou Problema
Pacientes que irão realizar vasectomia

**Descritores Gerais para as Condições de Saúde**

CID1-10:Classificação Internacional de Doenças

Código CID	Descrição CID
Z30.2	Esterilizacao

DeCS:Descritores em Ciência da Saúde

Código DECS	Descrição DECS
E04.950.599.900	Vasectomia

**Descritores Específicos para as Condições de Saúde**

CID1-10:Classificação Internacional de Doenças

Código CID	Descrição CID
Z30.2	Esterilizacao

DeCS:Descritores em Ciência da Saúde

Código DECS	Descrição DECS
E04.950.599.900	Vasectomia

Tipo de Intervenção: Sem intervenção

**Natureza da Intervenção**

- Biológica

**Descritores da Intervenção**

Descritores da Intervenção

Intervenções
Serão coletados material cirúrgico que teriam como destino o descarte

Fase

- Fase 4

Desenho:

Unicêntrico, comparativo de reatividade do ducto deferente a 6-nitrodopamina em banho isolado de órgãos e ensaios farmacológicos

**Apoio Financeiro**

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
				Financiamento Próprio

**Palavra Chave**

Palavra-chave
Ducto Deferente

## Detalhamento do Estudo

### Resumo:

Estudo científico em laboratório, de natureza básica, quantitativo, de procedimento experimental e com objetivo de estudo explicativo para avaliação das alterações da responsividade de ducto deferente em ensaios farmacológicos a fim de investigar as funções fisiológicas e fisiopatológicas da  $\delta$ -nitrodopamina.

### Introdução:

As catecolaminas como dopamina, epinefrina, norepinefrina, L-DOPA e outras moléculas são monoaminas que se diferem pelo seu radical na cadeia de compostos orgânicos. As catecolaminas são sintetizadas nas terminações nervosas simpáticas, sendo a tirosina transportada para dentro dos neurônios através de um transportador de aminoácidos aromáticos, que utiliza o gradiente de Na<sup>+</sup> através da membrana neuronal no qual ela é convertida através da catalise da enzima tirosina hidroxilase em L-DOPA (L-3,4-dihidroxi-fenilalanina) por oxidação da posição 3 no anel de benzeno. Neste estudo, será avaliado a liberação por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) e caracterização farmacológica dos efeitos do mediador endotélio  $\delta$ -nitrodopamina in vivo e in vitro

### Hipótese:

O endotélio presente nos vasos estariam habilitados a participar do controle por produzirem e secretarem catecolaminas

### Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos da  $\delta$ -nitrodopamina sobre o tônus do ducto deferente, Avaliar a produção de catecolaminas e  $\delta$ -nitrodopamina pelo ducto deferente humano;

### Objetivo Secundário:

Identificar e localizar enzimas envolvidas na síntese de catecolaminas (tirosina hidroxilase, dopamina beta-hidroxilase, dopa descarboxilase) no ducto deferente humano, Investigar o funcionamento de enzimas da via de síntese de catecolaminas em ducto deferente utilizando a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS).

### Metodologia Proposta:

Após a coleta, o ducto deferente será seccionado em stripes. Os stripes serão transferidos para cubas contendo 10 mL de solução Krebs-Henseleit, sob temperatura de 37°C, continuamente gaseificadas com uma mistura contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, o pH será ajustado e mantido entre 7,2 e 7,4. Os tecidos serão suspensos por uma haste metálica e fixados a um transdutor de força acoplado a um sistema de registros de tensão em milinewtons (mN). Os dados serão adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados PowerLab 4/30 (software versão 7.3.7 ADInstruments, Austrália) para o registro das tensões isométricas.

### Critério de Inclusão:

Participantes do sexo masculino com idade superior a 18 anos completos e inferior a 70 anos completos, que são legíveis a realização de vasectomia

### Riscos:

Não é previsto risco para esse estudo já que a equipe de pesquisa não terá contato com o participante. Pode haver algum risco de exposição dos dados do participante, porém o risco é mínimo tendo em vista que a equipe de pesquisa é pequena e estão em constante monitoramento.

### Benefícios:

Essa pesquisa não visa nenhum objetivo direto ao participante.

### Metodologia de Análise de Dados:

Avaliação da reatividade de tecidos isolados em banhos de órgãos através de transdutores de força PowerLab 400 data acquisition system (Software Chart, version 7.0; ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA). Variação da força de tensão (TIV) em milinewton (mN) e tensão isométrica de contração vascular (mN).

### Desfecho Primário:

Não se aplica

### Desfecho Secundário:

Não se aplica

Tamanho da Amostra no Brasil: 200

### Países de Recrutamento

País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	200

### Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Sim

Detalhamento:

Os dados serão consultados para confirmação de diagnósticos clínico laboratoriais e levantamento de dados retrospectivos da população do estudo.

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

200

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Grupo Único	200	Será coletado o material que iria para descarte. Não haverá intervenção direta com o participante

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Centros Coparticipantes

CNPJ	Nome da Instituição Co-participante	Nome do Responsável	Nome do Comitê de Ética	Instituição Selecionada Via Plataforma Brasil
10.739.462/0001-89	EDUARDO PEREIRA DOS SANTOS SERVICOS MEDICOS	Eduardo Pereira dos Santos		Sim

Propõe dispensa do TCLE?

Não

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Etapa Laboratorial	01/07/2023	01/08/2023
Etapa Analítica	19/10/2023	02/12/2023
Etapa Clínica	30/03/2023	30/06/2023

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Material de consumo	Custeio	R\$ 2.500,00
Serviços de terceiros	Custeio	R\$ 3.000,00
Total em R\$		R\$ 5.500,00

Bibliografia:

AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. *The American Journal of Physiology*, v.153, n.3, p.586-600, 1948. ANDERSSON, K-E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. *Physiological Reviews*, v.83, n.4, p.811-859, 2011. ANDERSSON, K-K.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. *Physiological Reviews*, v.75, n.1, p.193-236, January 1995. ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, v.97(6) 512-23, 2005. BAHIA, L et al. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006. BECERRA, S. M. B. Disfunções vesicais em ratos ovariectomizadas e efeitos da terapia de reposição de testosterona. 2016. 70f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2016. BERGERS, G.; SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*, v.7, p452-484, 2005. BRECKENRIDGE, R.A. Animal models of myocardial disease. In: CONN, P. M. *Animal models for the study of human disease*. 2nd ed. United States of America: Academic Press - Elsevier, 2017. p.145-147. BRITTO-JUNIOR, J., Jacintho, F. F., Figueiredo Murari, G. M., Campos, R., Moreno, R. A., Antunes, E., ... De Nucci, G. (2020, February 15). Electrical field stimulation induces endothelium-dependent contraction of human umbilical cord vessels. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31917992> BYLUND, D. B. IV. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological Reviews*, v.46, n.2, p.121-136, 1994. CAMPOS, R. et al. Tetrodotoxin-insensitive electrical field stimulation-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* corpus cavernosum. *PLoS ONE*, v.12, n.8, August 2017. CAMPOS, Rafael et al. Electrical field-induced contractions on *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* aortae are caused by endothelium-derived catecholamine. *PloSone*, v. 13, n. 9, p. e0203573, 2018.

## Upload de Documentos

## Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02020_Ducto_Deferente_Protocolo_emenda01_301122.pdf
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_FABIOLA.pdf
Comprovante de Recepção	PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_2093838.pdf
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_renan.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2216818_E2.pdf
Declaração de concordância	Declaracao_de_CONCORDANCIA_FABIOLA.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	02020_TCLE_emenda01.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	02020_TCLE_emenda01.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02020_Ducto_Deferente_Protocolo_emenda02_260923.pdf
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_FABIOLA.pdf
Outros	Fom_submissao_Emendas_02020_260923.pdf
Outros	02020_carta_emenda02.pdf
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_walter.pdf
Outros	Fom_submissao_Emendas_02020_260923.pdf
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02020_Ducto_Deferente_Protocolo_emenda02_260923.pdf
Outros	indaiaatuba_Anuencia_sig.pdf
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_walter.pdf
Comprovante de Recepção	PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1662302.pdf
Outros	indaiaatuba_Anuencia_sig.pdf
Outros	02020_carta_emenda02.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02020_Ducto_Deferente_Protocolo_emenda01_301122.pdf
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_CONCORDANCIA_renan.pdf

## Finalizar

Manter sigilo da íntegra do projeto de pesquisa: Sim

Prazo: Até a publicação dos resultados

Justificativa da Emenda:

Inclusão de membros de equipe.

Data de Submissão do Projeto: 19/10/2023

Nome do Arquivo: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2216818\_E2.pdf

Versão do Projeto: 3

## ARTIGO PUBLICADO

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology  
<https://doi.org/10.1007/s00210-023-02805-x>

## RESEARCH



## Alpha<sub>1</sub>-adrenergic blockers selectively antagonize the contractions induced by 6-nitrodopamine in the human vas deferens

José Britto-Júnior<sup>1</sup> · Renan Arthur Bosio Guimarães<sup>1</sup> · Denis Lima Oliveira<sup>1</sup> · Antonio Tiago Lima<sup>1</sup> · Gilberto Quirino Junior<sup>1</sup> · Gabriel Augusto de Oliveira Stocco<sup>1</sup> · Edson Hiroshi Salgado Uramoto<sup>2</sup> · Adriano Fregonesi<sup>1,2</sup> · Edson Antunes<sup>1</sup> · Gilberto De Nucci<sup>1,3,4</sup>

Received: 24 September 2023 / Accepted: 19 October 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

### Abstract

6-Nitrodopamine (6-ND) is released from human vas deferens and plays a modulatory role in the male ejaculation. Therapeutic use of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists is associated with ejaculatory abnormalities. To evaluate the effect of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists on the contractions induced by 6-ND, dopamine, noradrenaline, and adrenaline in the human epididymal vas deferens (HEVD). HEVD strips were suspended in glass chambers containing heated and oxygenated Krebs–Henseleit's solution. Cumulative concentration–response curves to catecholamines (10 nM–300  $\mu$ M) were constructed in HEVD strips pre-incubated (30 min) with doxazosin (0.1–1 nM), tamsulosin (1–10 nM), prazosin (10–100 nM) and/or silodosin (0.1–10 nM). The effects of these  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists were also evaluated in the electric-field stimulation (EFS, 2–32 Hz)-induced contractions. Doxazosin (0.1 nM) caused significant reductions in 6-ND-induced HEVD contractions without affecting the contractions induced by dopamine, noradrenaline, and adrenaline. Similar results were observed with tamsulosin (1 nM) and prazosin (10 nM). At these concentrations, these  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists largely reduced the EFS-induced contractions. Silodosin (1 nM) caused concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND but had no effect on the contractions induced by dopamine and adrenaline. Silodosin (0.1 nM) only inhibited the contractions induced by noradrenaline. Silodosin at 1 nM, but not at 0.1 nM, caused significant reductions in the EFS-induced contractions. The results reinforce the concept that 6-ND plays a major role in the human vas deferens contractility and indicate that the ejaculation disorders caused by doxazosin, tamsulosin, prazosin and silodosin cause in man, may be due to inhibition of the contractions induced by 6-ND rather than by the classical catecholamines dopamine, noradrenaline, and adrenaline.

**Keywords** Ejaculation · Delayed ejaculation ·  $\alpha$ -blockers

### Introduction

6-nitrodopamine (6-ND) is a novel catecholamine that is released from human umbilical cord vessels (Britto-Júnior et al. 2021a), human popliteal artery and vein (Oliveira et al. 2023) and human vas deferens (Britto-Júnior et al. 2022a), as detected by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Although in human vascular tissues 6-ND acts mainly as a potent vasorelaxant, in human vas deferens 6-ND causes smooth muscle contraction, which is blocked by tricyclic antidepressants such as amitriptyline and desipramine, at concentrations that do not affect the spasmogenic actions of dopamine, noradrenaline, and adrenaline (Britto-Júnior

José Britto-Júnior and Renan Arthur Bosio Guimarães contributed equally to this work.

✉ José Britto-Júnior  
 josebrittoj@dac.unicamp.br

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 126 Tessália Vieira de Camargo St, Campinas, São Paulo 13083-887, Brazil

<sup>2</sup> Department of Surgery, Faculty of Medicine of Jundiaí, Jundiaí, Brazil

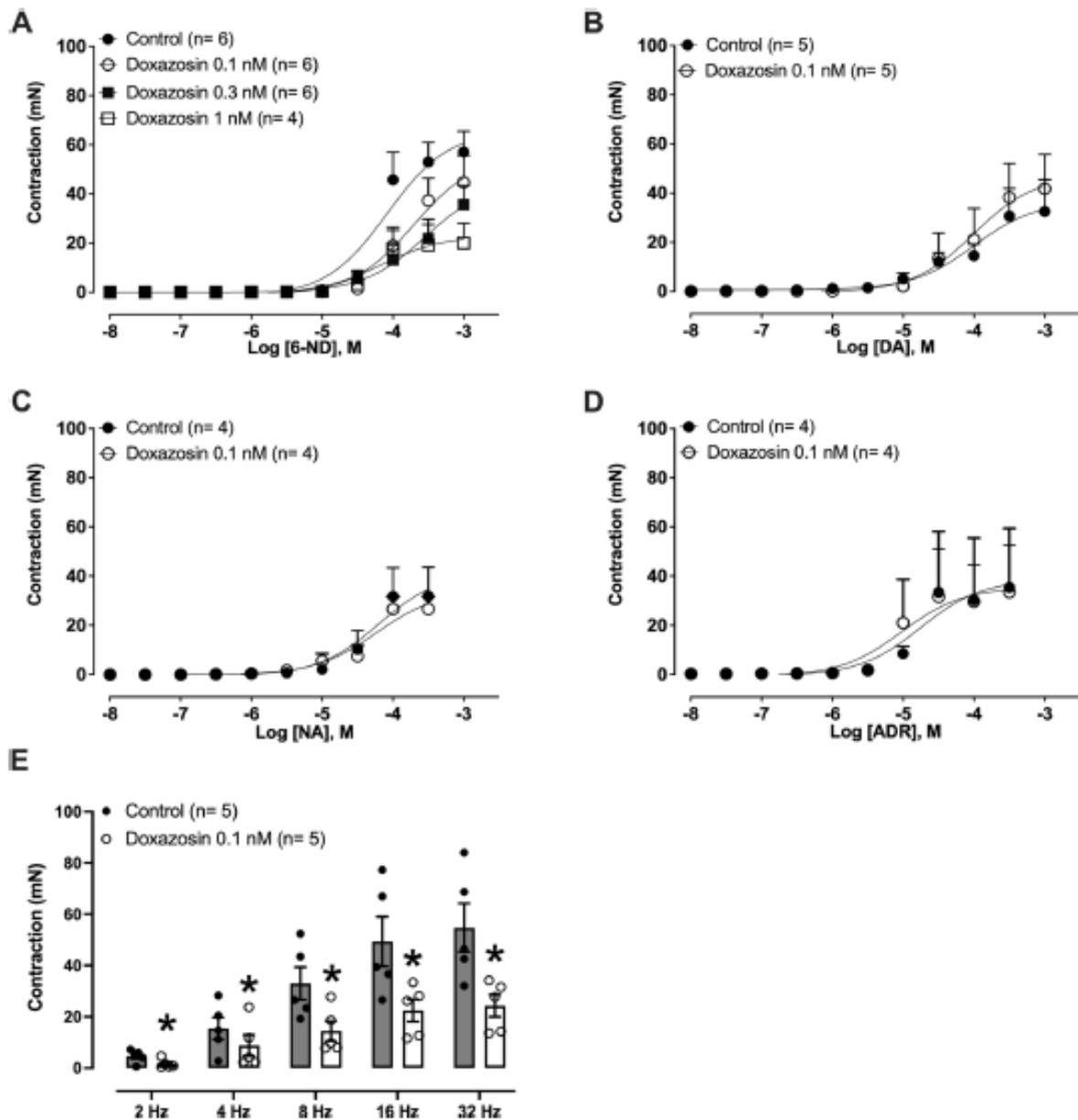
<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Metropolitan University of Santos, Santos, Brazil

et al. 2022a). Similar results have been observed in the rat epididymal vas deferens (Britto-Júnior et al. 2021b).

The  $\alpha_1$ -adrenoceptor family is composed of three receptor subtypes, namely  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$  (Andersson 2000). All

three receptor subtypes are expressed in the human prostate, although in different locations (Walden et al. 1999). Blockade of  $\alpha_1$ -adrenoceptors play an important role in the clinical management of patients with lower urinary tract



**Fig. 1** Effect of doxazosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Doxazosin (0.1–1 nM) induced concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Doxazosin (0.1 nM) had no effect on the contractions induced by dopa-

mine (DA, Panel B), noradrenaline (NA, Panel C) and adrenaline (ADR, Panel D). Doxazosin (0.1 nM; Panel E) caused significant inhibition of EFS-induced HEVD contractions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

symptoms (LUTS) caused by prostate hyperplasia (Roehrborn and Schwinn 2004), and the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists doxazosin, tamsulosin and silodosin are often used for LUTS relief (Debruyne 2000). Although the treatment with  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists is generally well tolerated, one of the most frequent adverse reactions is abnormal ejaculation, as characterized by delayed ejaculation or absence of ejaculation during orgasm (Cho and Yoo 2014). These adverse reactions could be due to inhibition of the emission phase of the ejaculation, in which the contraction of prostate, vas deferens, seminal vesicles and cauda epididymis occurs (Alwaal et al. 2015). Interestingly,  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists are now clinically used for the treatment of premature ejaculation (Gul et al. 2022).

In the rat isolated epididymal vas deferens, the contractions induced by 6-ND and by electric-field stimulation (EFS) are antagonized by pre-treatment of the vas deferens with doxazosin, tamsulosin, alfuzosin, terazosin and prazosin, at concentrations that do not block the contractions induced by dopamine, noradrenaline and adrenaline (Britto-Júnior et al. 2022b), indicating that these drugs could be acting as selective antagonists of 6-ND receptor rather than as  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists. Fluorescence histochemistry and biochemical detection of catecholamines revealed significant differences between rat and human vas deferens (Kaleczyc 1998), i.e., the former receives numerous adrenergic nerve fibres (Owman and Sjostrand 1965), whereas the latter presents less dense adrenergic innervation (Alm 1982; Baumgarten et al. 1968). Thus, we have investigated whether  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists would have inhibitory action on the contractions induced by 6-ND in human vas deferens.

## Materials and methods

### Study participants

Participants who underwent vasectomy surgery in Centro Clínico NotreDame Intermedicas (Jundiaí, Sao Paulo) signed an informed consent approved by the Institute of Biomedical Sciences (ICB-USP) Institutional Review Board (Protocol number 4.468.508). The human epididymal vas deferens (HEVD) were obtained from 125 participants aged 28–59 years. The surgical procedure (Rogers & Kolettis 2013) was performed under local anaesthesia and the excised segment (1.5 cm length) was taken at approximately 9 cm from the cauda epididymis.

### HEVD functional assays

The HEVD strips (1.5 cm length) were suspended in a 10-mL glass chamber containing heated (37°C) and

oxygenated (95%O<sub>2</sub>: 5%CO<sub>2</sub>) KHS. The isometric tension was kept at 10 mN and registered by a PowerLab system (ADInstruments, Dunedin, New Zealand). After a 45-min stabilization period, the HEVD strips were initially contracted with potassium chloride (KCl, 80 mM) to evaluate the tissue viability. After KCl removal and return to the baseline (15 min approximately), cumulative concentration–response curves to 6-ND (0.0001–1 mM) were constructed in control HEVD strips and in tissues pre-incubated with doxazosin (0.1, 0.3 and 1 nM, 30 min), tamsulosin (0.1, 1 and 10 nM, 30 min), prazosin (10, 30 and 100 nM, 30 min) and/or silodosin (0.1, 1, 3 and 10 nM, 30 min). Cumulative concentration–response curves to noradrenaline were constructed in HEVD pre-incubated or not with doxazosin (0.1 nM, 30 min), tamsulosin (1 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) and/or silodosin (0.1 and 10 nM, 30 min). Cumulative concentration–response dopamine and adrenaline were constructed in HEVD pre-incubated or not with doxazosin (0.1 nM, 30 min), tamsulosin (1 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) and/or silodosin (1 nM, 30 min). A typical experiment lasts 2.5–3 h (30 min to set up the tissue, 45 min for stabilization, 15 min for KCl evaluation, 30 min for drug incubation and 30 min to perform the concentration–response curve).

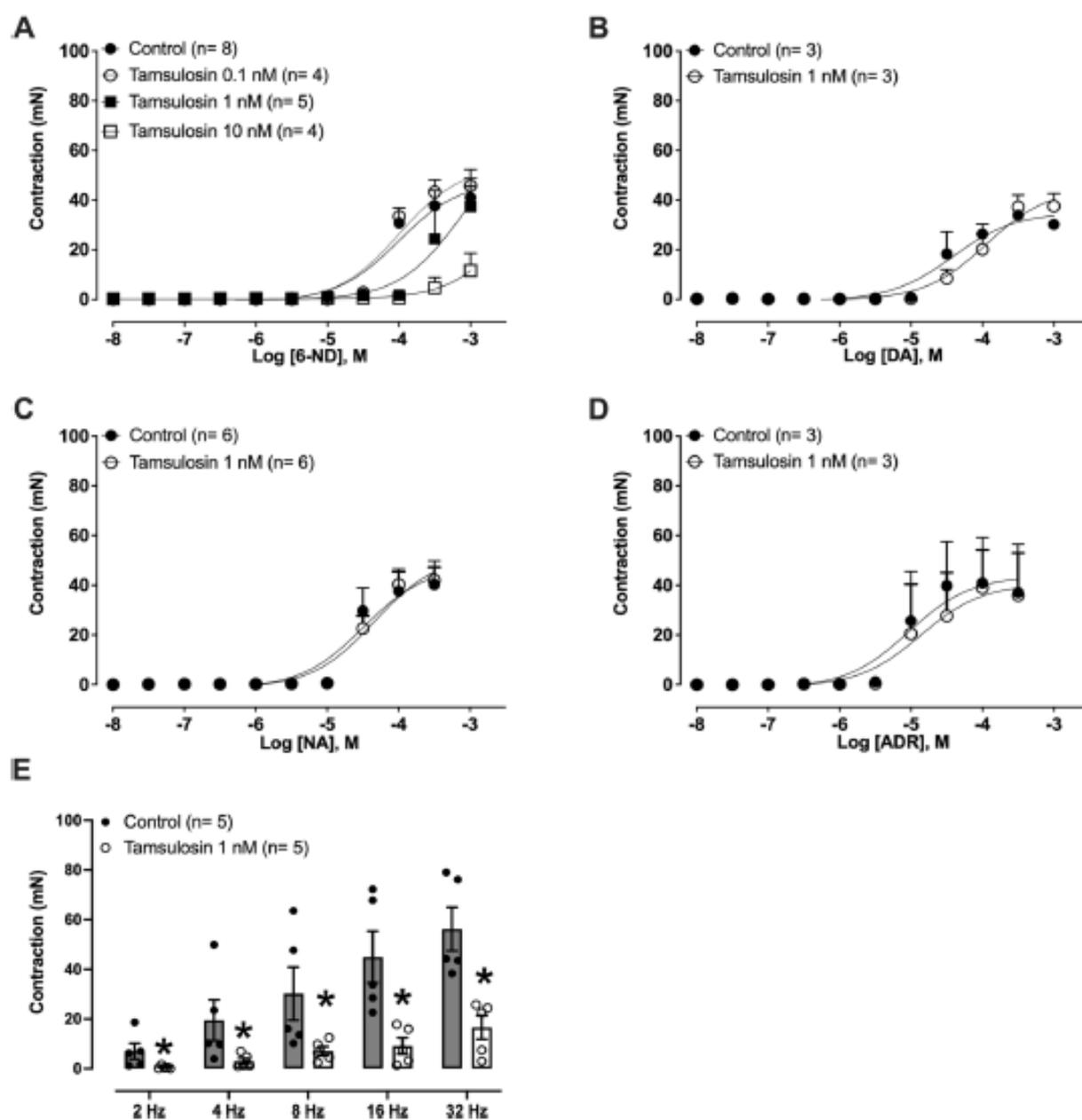
### Electric-field stimulation (EFS) in HEVD preparations

The HEVD strips were submitted to EFS (60 V for 20 s, at 2–32 Hz in square-wave pulses, 0.3 ms pulse width, and 0.1 ms delay), using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical,

**Table 1** The effect of doxazosin on the potency (pEC<sub>50</sub>) and maximal responses (E<sub>max</sub>) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA) in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	pEC <sub>50</sub> (log[M])	E <sub>max</sub> (mN)	n
6-ND	4.10 ± 0.15	57.08 ± 8.49	6
+ doxazosin 0.1 nM	3.71 ± 0.19*	44.66 ± 10.98	6
+ doxazosin 0.3 nM	3.54 ± 0.22*	35.66 ± 7.87*	6
+ doxazosin 1 nM	4.20 ± 0.31	20.01 ± 8.10*	4
DA	3.99 ± 0.30	33.53 ± 12.01	6
+ doxazosin 1 nM	4.01 ± 0.30	41.77 ± 13.98	6
NA	4.19 ± 0.14	31.9 ± 11.8	4
+ doxazosin 1 nM	4.04 ± 0.31	26.7 ± 5.1	4
ADR	4.85 ± 0.19	35.4 ± 17.1	4
+ doxazosin 1 nM	5.06 ± 0.52	33.6 ± 25.8	4

pEC<sub>50</sub> is defined as the negative logarithm of the EC<sub>50</sub>. E<sub>max</sub> is the maximal effect at the highest drug concentration. The pEC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> were expressed as mean ± SEM (n means the number of vas deferens strips). \*P < 0.05 compared with respective control values



**Fig. 2** Effect of tamsulosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Tamsulosin (1 and 10 nM) provoked concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Tamsulosin (1 nM) had no effect on the contractions induced by

dopamine (DA, Panel B), noradrenaline (NA, Panel C) and adrenaline (ADR, Panel D). Tamsulosin (1 nM; Panel E) caused significant inhibition of EFS-induced HEVD contractions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

**Table 2** The effect of tamsulosin on the potency ( $pEC_{50}$ ) and maximal responses ( $E_{max}$ ) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA) in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	$pEC_{50}$ (log[M])	$E_{max}$ (mN)	<i>n</i>
6-ND	4.01 ± 0.12	41.93 ± 4.52	8
+ tamsulosin 0.1 nM	4.00 ± 0.10	45.75 ± 6.63	4
+ tamsulosin 1 nM	3.45 ± 0.07*	37.36 ± 11.47	5
+ tamsulosin 10 nM	-	11.58 ± 7.01*	4
DA	4.59 ± 0.22	30.23 ± 0.91	3
+ tamsulosin 1 nM	4.03 ± 0.10	37.54 ± 5.06	3
NA	4.37 ± 0.11	40.32 ± 9.45	6
+ tamsulosin 1 nM	4.38 ± 0.08	42.01 ± 5.21	6
ADR	5.03 ± 0.18	37.15 ± 19.33	3
+ tamsulosin 1 nM	4.86 ± 0.24	35.93 ± 16.99	3

$pEC_{50}$  is defined as the negative logarithm of the  $EC_{50}$ .  $E_{max}$  is the maximal effect at the highest drug concentration. The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  were expressed as mean ± SEM (*n* means the number of vas deferens strips). – means that it was not possible to calculate the  $pEC_{50}$ , since at this concentration, the antagonist abolished the contractions induced by 6-ND. \* $P < 0.05$  compared with respective control values

Industrial Park, RI, USA). The EFS-induced HEVD contractions were conducted in control and tissues pre-incubated with doxazosin (0.1 nM, 30 min), tamsulosin (1 nM, 30 min), prazosin (10 nM, 30 min) and/or silodosin (0.1 and 1 nM, 30 min).

## Materials and drugs

Dopamine and prazosin were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St Louis, Missouri, USA). Adrenaline, noradrenaline and silodosin were purchased from Cayman Chemical Co (Michigan, USA). 6-Nitrodopamine was acquired from Toronto Research Chemicals (Ontario, CA). Tamsulosin was obtained from Swati Spentose Pvt Ltd (Vapi, Gujarat, India). Doxazosin was obtained from Nifty Labs Pvt Ltd (Hyderabad, Telangana, India). Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), calcium chloride ( $CaCl_2$ ), magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ), sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ ), potassium phosphate monobasic ( $KH_2PO_4$ ) and glucose were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

## Data analysis

The values of  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data represent the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of *n* experiments. Values of  $E_{max}$  were expressed in mN. One was used as the control response and the other HEVD was incubated with an antagonist / inhibitor.

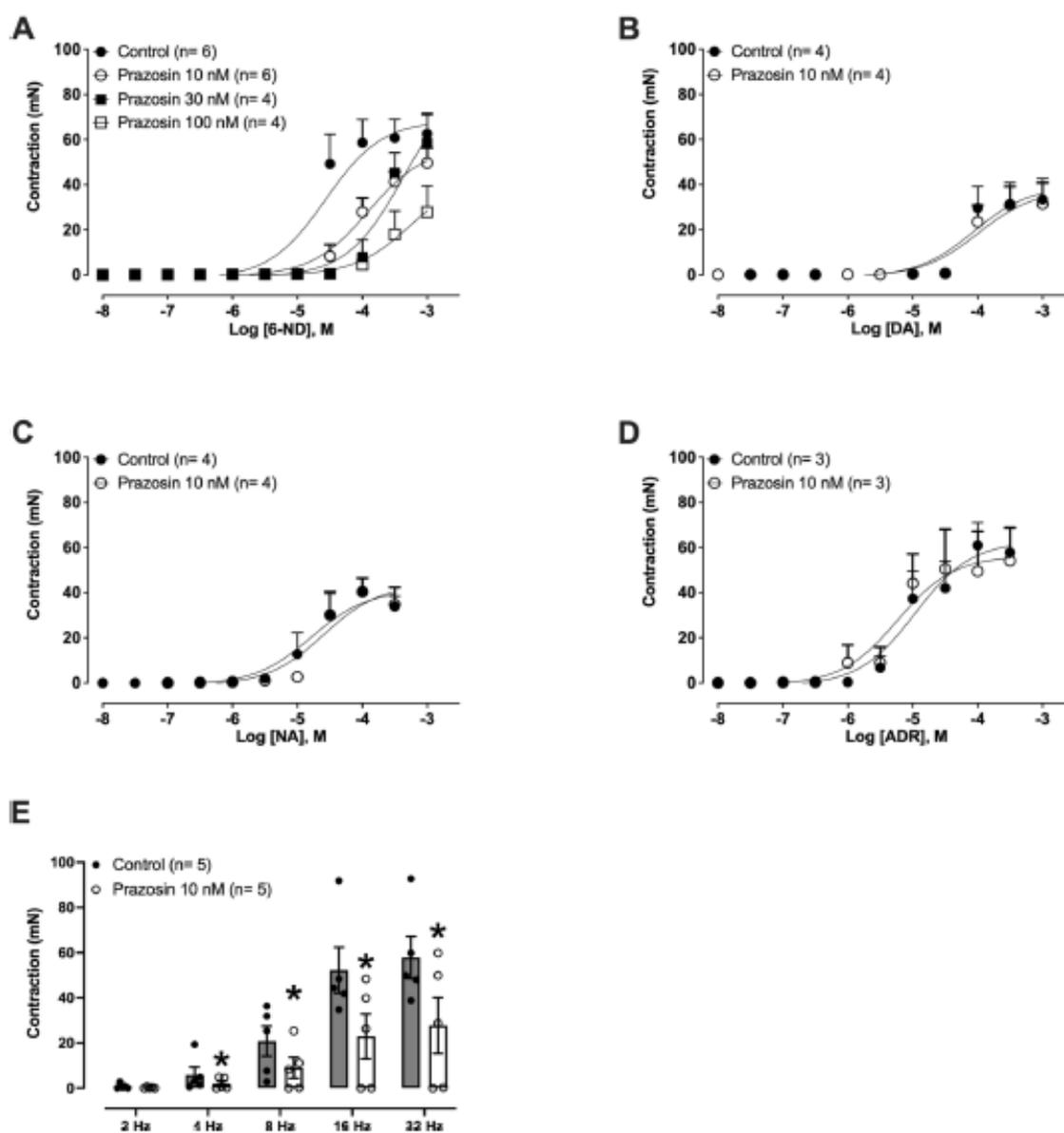
The  $pA_2$  values of the antagonists were calculated from application of the equation;  $pA_2 = \log(\text{antagonist concentration}) - \log(\text{CR}-1) - \log(\text{antagonist concentration})$ . The methods for determining both  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  were described elsewhere (Britto-Júnior et al. 2022a). Student's two-tail unpaired t-test was employed and the differences between groups. In addition, standard ANOVA, followed by the Newman-Keuls post-test, were used when more than two groups were involved. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant. The distribution of the log values ( $pEC_{50}$ ) was normal for each agonist, confirmed by the Shapiro-Wilk test (Motulsky 2014).

## Results

### Effect of doxazosin

Cumulative addition of 6-ND ( $10^{-8}$  to  $10^{-3}$  M; Fig. 1A), dopamine ( $10^{-8}$  to  $10^{-3}$  M; Fig. 1B), noradrenaline ( $10^{-8}$  to  $3 \times 10^{-4}$  M; Fig. 1C) and adrenaline ( $10^{-8}$  to  $3 \times 10^{-4}$  M; Fig. 1D) produced concentration-dependent contractions in the HEVD strips (Fig. 1A). The in vitro pretreatment (30 min) of the HEVD with doxazosin (0.1–1 nM) significantly reduced the  $E_{max}$  values to 6-ND with a  $pA_2$  value of  $10.38 \pm 0.20$  ( $n = 6$ ). However, doxazosin (0.1 nM) did not affect  $E_{max}$  and  $pEC_{50}$  the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 1B), noradrenaline (Fig. 1C) and adrenaline (Fig. 1D). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and doxazosin-treated preparations are shown in Table 1.

Electrical-field stimulation (EFS; 2–32 Hz) evoked frequency-dependent contractile responses in the HEVD strips (Fig. 1E), which were significantly reduced by doxazosin (0.1 nM) in all frequencies tested ( $p = 0.0001$ ;  $n = 6$ ; Fig. 1E).



**Fig. 3** Effect of prazosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Prazosin (10–30 nM) caused concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Prazosin (10 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine

(DA, Panel B), noradrenaline (NA, Panel C) and adrenaline (ADR, Panel D). Prazosin (10 nM; Panel E) caused significant inhibition of EFS-induced contractions of the HEVD. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

**Table 3** The effect of prazosin on the potency ( $pEC_{50}$ ) and maximal responses ( $E_{max}$ ) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA) in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	$pEC_{50}$ (log[M])	$E_{max}$ (mN)	$n$
6-ND	4.62 ± 0.11	62.55 ± 8.31	6
+ prazosin 10 nM	4.08 ± 0.25*	49.64 ± 6.67	6
+ prazosin 30 nM	3.47 ± 0.30*	58.42 ± 13.26	4
+ prazosin 100 nM	3.12 ± 1.24*	27.89 ± 11.66*	4
DA	4.62 ± 0.05	33.42 ± 9.26	4
+ prazosin 10 nM	4.55 ± 0.10	31.39 ± 9.44	4
NA	4.73 ± 0.34	32.25 ± 4.9	4
+ prazosin 10 nM	4.68 ± 0.22	34.79 ± 7.55	4
ADR	5.14 ± 0.29	57.76 ± 11.25	3
+ prazosin 10 nM	5.19 ± 0.33	54.14 ± 14.53	3

$pEC_{50}$  is defined as the negative logarithm of the  $EC_{50}$ .  $E_{max}$  is the maximal effect at the highest drug concentration. The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  were expressed as mean ± SEM.  $n$  means the number of vas deferens strips. \* $P < 0.05$  compared with respective control values

### Effect of tamsulosin

Pre-treatment (30 min) of the HEVD with tamsulosin (1 and 10 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to 6-ND (Fig. 2A) with a  $pA_2$  value of  $9.63 \pm 0.06$  ( $n = 5$ ). At 10 nM, tamsulosin nearly abolished the 6-ND-induced contractions (Fig. 2A). Tamsulosin (1 nM) did not affect the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 2B), noradrenaline (Fig. 2C) and adrenaline (Fig. 2D). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and tamsulosin-treated preparations are shown in Table 2.

Tamsulosin (1 nM) caused marked reductions ( $p = 0.0002$ ) in the HEVD contractions induced by EFS (2–32 Hz; Fig. 2E).

### Effect of prazosin

Pre-treatment (30 min) of the HEVD with prazosin (10–100 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to 6-ND (Fig. 3A) with a  $pA_2$  value of  $8.23 \pm 0.52$  ( $n = 6$ ). At 100 nM, prazosin markedly reduced the maximal responses to 6-ND (Fig. 3A). Prazosin (10 nM) did not affect the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 3B), noradrenaline (Fig. 3C) and adrenaline (Fig. 3D). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and prazosin-treated preparations are shown in Table 3.

Prazosin (10 nM) caused significant reductions ( $p = 0.0042$ ) in the HEVD contractions induced by EFS (2–32 Hz; Fig. 3E).

### Effect of silodosin

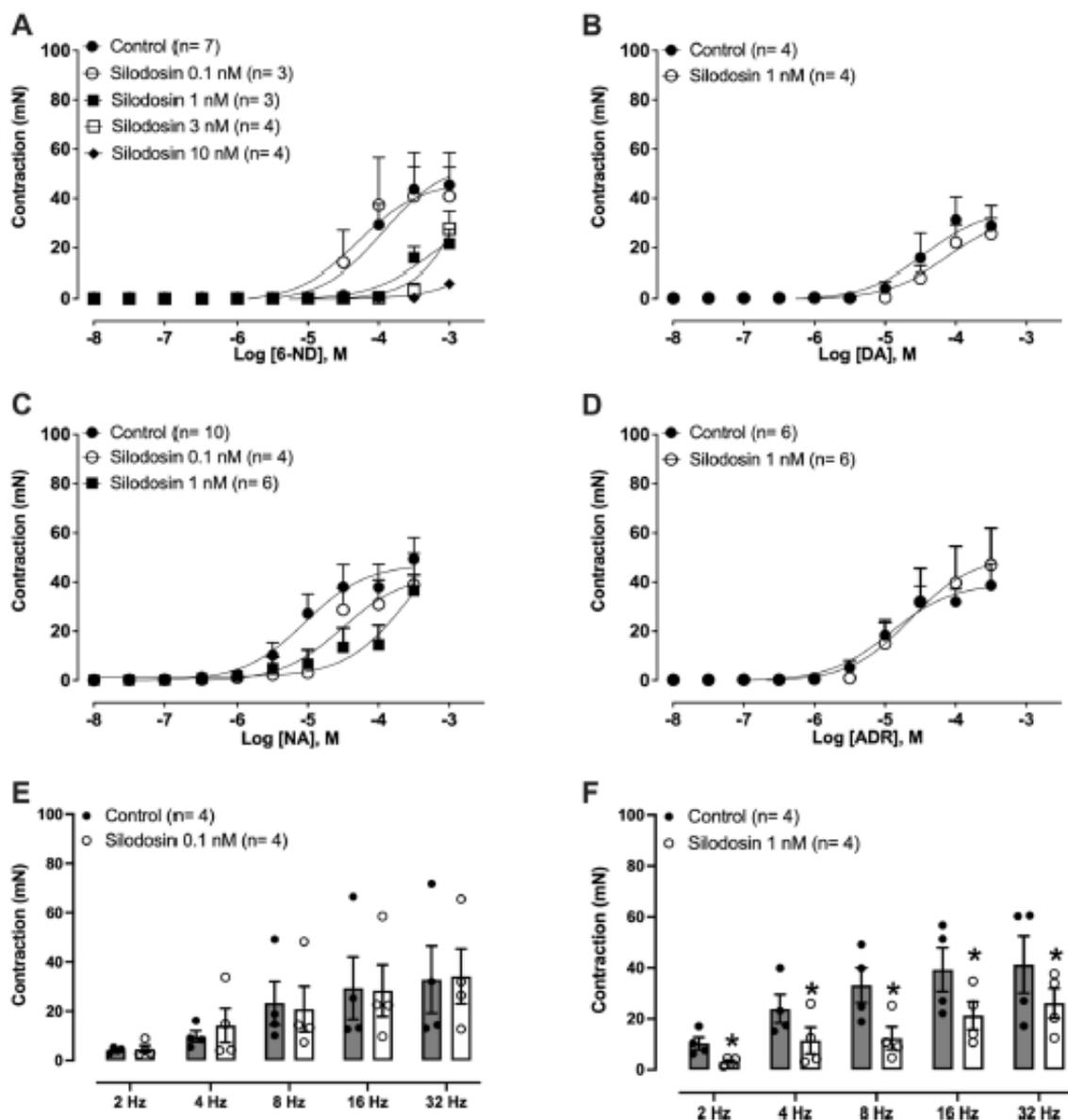
Pre-treatment of the HEVD with silodosin (1–10 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to 6-ND (Fig. 4A) with a  $pA_2$  value of  $9.84 \pm 0.06$  ( $n = 3$ ). At 10 nM, silodosin almost abolished the contractions induced by 6-ND (Fig. 4A). Silodosin (1 nM) did not affect the HEVD contractions induced by dopamine (Fig. 4B) and adrenaline (Fig. 4D). Silodosin (0.1 and 1 nM) caused significant rightward shifts on the concentration–response curves to noradrenaline (Fig. 4C) with a  $pA_2$  value of  $10.71 \pm 0.12$  ( $n = 6$ ). The  $pEC_{50}$  and  $E_{max}$  data for 6-ND, dopamine, noradrenaline and adrenaline in control and silodosin-treated preparations are shown in Table 4.

Silodosin (0.1 nM) did not affect the EFS-induced HEVD contractions (Fig. 4E). However, at 1 nM, silodosin caused significant reductions in the HEVD contractions induced by EFS (Fig. 4F).

### Discussion

Incidence of abnormal ejaculation is a typical adverse reaction of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists (Michel 2007). This class of drugs induces relaxations of prostate, urethra and bladder neck smooth muscle (Andersson 2000), reducing the resistance of the prostatic urethra and bladder neck to the ejaculate coming from the vas deferens, thus allowing retrograde ejaculation to occur (van Dijk et al. 2006). However, in healthy volunteers treated for 5 days with either tamsulosin or alfuzosin, few individuals (95%) had increased post-ejaculate in the urine, indicating that  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists may cause anejaculation rather than retrograde ejaculation (Hellstrom et al. 2005); Thus, evaluation of the effect of these compounds in human vas deferens and seminal vesicles may provide useful information on the mechanism(s) involved.

Silodosin (KMD-3213; Shibata et al. 1995) has an increased affinity to adrenoceptor  $\alpha_{1A}$  (0.039 nM) compared to  $\alpha_{1B}$  (6.5 nM) and  $\alpha_{1D}$  (2.2 nM; Tatemichi et al. 2006) in the lower urinary tract. In comparison to the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists alfuzosin (Ramsay et al. 1988), doxazosin (Elliott et al. 1982; Wilt and MacDonald 2006), tamsulosin (Lepor et al. 1988; Dunn et al. 2002), terazosin (Frishman et al. 1988; O'Leary 2001), and prazosin



**Fig. 4** Effect of silodosin in the human epididymal vas deferens (HEVD) contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), dopamine, noradrenaline, adrenaline and electric-field stimulation (EFS). Silodosin (1–10 nM) caused concentration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to 6-ND (Panel A). Silodosin (1 nM) had no effect on the contractions induced by dopamine (DA, Panel B) and adrenaline (ADR, Panel D), but caused concen-

tration-dependent rightward shifts of the concentration–response curves to noradrenaline (NA, Panel C). Silodosin (0.1 nM) significantly reduced the EFS-induced contractions at 1 nM (Panel F), but not at 0.1 nM (1 nM; Panel E). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with respective control values ( $n$  means the number of vas deferens strips)

**Table 4** The effect of silodosin on the potency ( $pEC_{50}$ ) and the maximum response ( $E_{max}$ ) of the contractions induced by 6-nitrodopamine (6-ND), noradrenaline (NA), adrenaline (ADR), and dopamine (DA), in the human isolated epididymal vas deferens

Catecholamine	$pEC_{50}$ (log[M])	$E_{max}$ (mN)	$n$
6-ND	$3.93 \pm 0.16$	$45.43 \pm 7.38$	7
+ silodosin 0.1 nM	$4.15 \pm 0.12$	$40.81 \pm 17.69$	3
+ silodosin 1 nM	$3.19 \pm 0.13^*$	$21.57 \pm 5.94^*$	3
+ silodosin 3 nM	-	$27.53 \pm 7.26^*$	4
+ silodosin 10 nM	-	$6.02 \pm 1.18^*$	4
DA	$4.35 \pm 0.23$	$28.71 \pm 8.33$	4
+ silodosin 1 nM	$4.09 \pm 0.32$	$25.50 \pm 6.44$	4
NA	$5.04 \pm 0.17$	$49.37 \pm 8.6$	10
+ silodosin 0.1 nM	$4.51 \pm 0.22^*$	$38.82 \pm 12.96$	4
+ silodosin 1 nM	$3.56 \pm 0.35^*$	$36.56 \pm 6.33$	6
ADR	$4.92 \pm 0.15$	$38.68 \pm 8.83$	6
+ silodosin 1 nM	$4.63 \pm 0.25$	$46.98 \pm 14.90$	6

$pEC_{50}$  is defined as the negative logarithm of the  $EC_{50}$ .  $E_{max}$  is the maximal effect at the highest drug concentration. The  $pEC_{50}$ ,  $E_{max}$  and the mean shifts were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n$  means the number of vas deferens strips). - means that it was not possible to calculate the  $pEC_{50}$ , since at this concentration, the antagonist abolished the contractions induced by 6-ND. \* $P < 0.05$  compared with respective control values

**Table 5** Reported values for the inhibitor constant ( $K_i$ ) in nM of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists

	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1D}$	Reference
Doxazosin	1.99	0.72	1.66	Hatano et al. 1996
Tamsulosin	0.19	2.00	0.20	Chiu et al. 2007
Prazosin	0.62	0.61	0.38	Vicentic et al. 2002
Silodosin	0.04	6.50	2.20	Ramsay et al. 1988

(U'Prichard et al. 1978), silodosin was the most potent antagonist on the contractions induced by noradrenaline in the rat epididymal vas deferens (Britto-Júnior et al. 2022b). As shown here, silodosin was also more potent than tamsulosin, doxazosin and prazosin to inhibit noradrenaline-induced HEVD contractions. Interestingly, silodosin was the only  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist that was more potent to inhibit HEVD contractions induced by noradrenaline, as compared to those induced by 6-ND. Since tamsulosin and silodosin are the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists more associated with abnormal ejaculation (Cui et al. 2012), selectivity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor subtype could be the mechanism involved in this adverse reaction. Indeed,

incidence of abnormal ejaculation in patients treated with prazosin is rare, and in the rat isolated vas deferens, prazosin presents low potency on  $\alpha_{1A}$ - and high potency on  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor (Docherty 2013). The reported  $K_i$  values for the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists doxazosin, tamsulosin, prazosin, and silodosin, are described in Table 5.

6-Nitrodopamine concentration-dependently contracts both rat (Britto-Júnior et al. 2021b) and human (Britto-Júnior et al. 2022a) vas deferens, but more importantly, potentiates the contractile action of the dopamine, noradrenaline, and adrenaline in rat epididymal vas deferens at a very low concentration such as 10 pM (Britto-Júnior et al. 2023a). Although this mechanism is not clear, the potentiation is abolished when the vas deferens is pre-treated with the voltage-gated sodium channel blocker tetrodotoxin, suggesting that may be due to activation of adrenergic terminals (Britto-Júnior et al. 2023a). A similar potentiation of 6-ND on the increased atrial frequency induced by dopamine, noradrenaline and adrenaline was observed in the rat isolated atria (Britto-Júnior et al. 2023b). The blockade of  $\alpha_{1A}$  adrenoceptors in the rat vas deferens could lead to infertility (Michel 2007); however, in  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype-selective knockout mice ( $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor knockout), the contractions of the vas deferens induced by electric-field stimulation was reduced by 60–70%, but not abolished (Sanbe et al. 2007), indicating the presence of another receptor responsible for the observed contractions. This receptor could be the *hypothetical* 6-ND receptor. Our finding that silodosin, at a concentration (100 pM) that caused marked reductions in noradrenaline-induced contractions, did not affect the contractions induced by EFS, reinforces the concept that 6-ND is a major modulator of human vas deferens contractility (Britto-Júnior et al. 2022a). Indeed, inhibition of the EFS-induced HEVD contractions was only observed when the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists were used at concentrations that inhibited those induced by 6-ND.

Inconsistencies in the interactions of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists and ejaculatory function have been observed in mouse, rat and human data (Michel 2007), and as summarized in Table 6, they are also present in the pharmacology of 6-ND in rat and human vas deferens. The remarkable synergism between 6-ND and the classical catecholamines (dopamine, noradrenaline, and adrenaline) has been described so far only on the rat epididymal vas deferens (Britto-Júnior et al. 2023a) and rat isolated right atrium (Britto-Júnior et al. 2023b). Thus, it would be important to confirm the synergism in HEVD.

**Table 6** Results obtained with 6-nitrodopamine (6-ND) in the rat and human vas deferens

	Rat	Ref	Human	Ref
6-ND release (ng/mL)	1.4 ± 0.4	Britto-Júnior et al. 2021b	1.9 ± 0.8	Britto-Júnior et al. 2022a
Noradrenaline (ng/mL)	0.4 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2021b	0.5 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2022a
Dopamine release (ng/mL)	below LOQ	Britto-Júnior et al. 2021b	0.3 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
Adrenaline release (ng/mL)	below LOQ	Britto-Júnior et al. 2021b	0.2 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
L-NAME on 6-ND release	reduced	Britto-Júnior et al. 2021b	reduced	Britto-Júnior et al. 2022a
6-ND contractile (pEC <sub>50</sub> )	5.2 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2023a	<b>4.6 ± 0.1</b>	this manuscript
TTX on EFS contraction	abolished	Lima et al. 2022	?	
L-NAME on EFS contraction	no effect	Britto-Júnior et al. 2021b	reduced	Britto-Júnior et al. 2022a
Potentials DA, NA and ADR	potentiation	Britto-Júnior et al. 2023a	?	
Tricyclic compounds (pA <sub>2</sub> ):				
Amitriptyline	7.7 ± 0.5	Britto-Júnior et al. 2021b	8.9 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
Desipramine	8.2 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2021b	9.5 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
Carbamazepine	7.7 ± 0.4	Britto-Júnior et al. 2021b	8.8 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a
α <sub>1</sub> antagonists (pA <sub>2</sub> ):				
Doxazosin	9.1 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>10.3 ± 0.2</b>	this manuscript
Tamsulosin	9.7 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>9.3 ± 0.1</b>	this manuscript
Silodosin	8.8 ± 0.1	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>9.8 ± 0.1</b>	this manuscript
Prazosin	7.7 ± 0.2	Britto-Júnior et al. 2022a	<b>8.2 ± 0.5</b>	this manuscript
β <sub>1</sub> - and β <sub>1</sub> /β <sub>2</sub> antagonists (pA <sub>2</sub> ):				
Atenolol	6.5 ± 0.5	Lima et al. 2022	?	
Betaxolol	6.9 ± 0.1	Lima et al. 2022	?	
metoprolol	6.7 ± 0.1	Lima et al. 2022	?	
propranolol	6.5 ± 0.3	Lima et al. 2022	?	
pindolol	5.7 ± 0.1	Lima et al. 2022	?	

LOQ limit of quantitation

Furthermore, purification and sequence of the 6-ND receptor from human vas deferens should help to deep our understanding on the physiological processes involved in the ejaculation.

## Conclusion

The α<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonists doxazosin, tamsulosin, prazosin and silodosin only block the contractions of human isolated vas deferens at concentrations that inhibit 6-ND induced contractions reinforcing the concept that this novel catecholamine acts as a major modulator of human vas deferens contractility.

**Author Contributions** Conceptualization: JBJ, GDN. Data curation: JBJ, GDN. Formal analysis: GDN. Funding acquisition: EA, GDN. Investigation: RABG, JBJ, ATL, DLO, GQJ, GAOS. Methodology: RABG, ATL. Project administration: GDN. Supervision: EA and GDN. Visualization: AF, EA, GDN. Writing – original draft: JBJ, GDN. The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

**Funding** Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2021/14414-8 (JBJ), 2021/13593-6 (ATL), 2022/08022-2 (GQJ), 2017/15175-1 (EA), 2019/16805-4 (GDN).

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 303,839/2019-8 (GDN).

**Data availability** The authors authorize the availability of any data used in this study.

## Declarations

**Ethical approval** The investigation followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo – ICB/USP (protocol number 4.468.508), and the patients were asked to sign an informed consent.

**Consent to participate** Not applicable.

**Consent to publish** The authors authorize the submission and publication of this article in *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Alm P (1982) On the autonomic innervation of the human vas deferens. *Brain Res Bull* 9:673–677. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90172-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90172-1)
- Alwaal A, Breyer BN, Lue TF (2015) Normal male sexual function: emphasis on orgasm and ejaculation. *Fertil Steril* 104:1051–1060. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.033>
- Andersson KE (2000) Mode of action of alpha1-adrenoceptor antagonists in the treatment of lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 85(Suppl 2):12–18. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00059.x>
- Baumgarten HG, Falck B, Holstein AF, Owman C, Owman T (1968) Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 90:81–95. <https://doi.org/10.1007/BF00496704>
- Britto-Júnior J, Coelho-Silva WC, Murari GF, Serpellone Nash CE, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2021a) 6-Nitrodopamine is released by human umbilical cord vessels and modulates vascular reactivity. *Life Sci* 1(276):119425. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119425>
- Britto-Júnior J, Ximenes L, Ribeiro A, Fregonesi A, Campos R, Ricardo de Almeida Kiguti L, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2021b) 6-Nitrodopamine is an endogenous mediator of rat isolated epididymal vas deferens contractions induced by electric-field stimulation. *Eur J Pharmacol*. 15(911):174544. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174544>
- Britto-Júnior J, da Silva-Filho WP, Amorim AC, Campos R, Moraes MO, Moraes MEA, Fregonesi A, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022a) 6-nitrodopamine is a major endogenous modulator of human vas deferens contractility. *Andrology* 10:1540–1547. <https://doi.org/10.1111/andr.13263>
- Britto-Júnior J, Ribeiro A, Ximenes L, Lima AT, Jacintho FF, Fregonesi A, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022b) Alpha1-adrenergic antagonists block 6-nitrodopamine contractions on the rat isolated epididymal vas deferens. *Eur J Pharmacol* 15(915):174716. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174716>
- Britto-Júnior J, Lima AT, Campos R, Gião AA, Mendes GD, Ferreira-Novais Silva LP, Fregonesi A, Pupo AS, Antunes E, De Nucci G (2023a) 6-Nitrodopamine potentiates contractions of rat isolated vas deferens induced by noradrenaline, adrenaline, dopamine and electric field stimulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396:2555–2570. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02478-6>
- Britto-Júnior J, Lima AT, Fuguhara V, Monica FZ, Antunes E, De Nucci G (2023b) Investigation on the positive chronotropic action of 6-nitrodopamine in the rat isolated atria. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396:1279–1290. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02394-9>
- Chiu G, Li S, Cai H, Connolly PJ, Peng S, Stauber K, Pulito V, Liu J, Middleton SA (2007) Aminocyclohexylsulfonamides: discovery of metabolically stable alpha(1a/1d)-selective adrenergic receptor antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms (BPH/LUTS). *Bioorg Med Chem Lett* 17(22):6123–6128. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.051>
- Cho HJ, Yoo TK (2014) Silodosin for the treatment of clinical benign prostatic hyperplasia: safety, efficacy, and patient acceptability. *Res Rep Urol* 26(6):113–119. <https://doi.org/10.2147/RRU.S41618>
- Cui Y, Zong H, Zhang Y (2012) The efficacy and safety of silodosin in treating BPH: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 44:1601–1609. <https://doi.org/10.1007/s11255-012-0261-6>
- Debruyne FM (2000) Alpha blockers: are all created equal? *Urology* 1;56(5 Suppl 1):20–2. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00744-5](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00744-5)
- Docherty JR (2013) Prazosin has low potency at  $\alpha 1A$ -adrenoceptors and high potency at  $\alpha 1D$ -adrenoceptors in rat vas deferens. *Auton Autacoid Pharmacol* 33(3–4):49–57. <https://doi.org/10.1111/aap.12015>
- Dunn CJ, Matheson A, Faulds DM (2002) Tamsulosin: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. *Drugs Aging* 19:135–161. <https://doi.org/10.2165/00002512-200219020-00004>
- Elliott HL, Meredith PA, Sumner DJ, McLean K, Reid JL (1982) A pharmacodynamic and pharmacokinetic assessment of a new alpha-adrenoceptor antagonist, doxazosin (UK33274) in normotensive subjects. *Br J Clin Pharmacol* 13:699–703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1982.tb01439.x>
- Frishman WH, Eisen G, Lapsker J (1988) Terazosin: a new long-acting alpha 1-adrenergic antagonist for hypertension. *Med Clin North Am* 72:441–448. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30778-7](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30778-7)
- Gul M, Bocu K, Serefoglu EC (2022) Current and emerging treatment options for premature ejaculation. *Nat Rev Urol* 19:659–680. <https://doi.org/10.1038/s41585-022-00639-5>
- Hatano A, Tang R, Walden PD, Lepor H (1996) The alpha-adrenoceptor antagonist properties of the enantiomers of doxazosin in the human prostate. *Eur J Pharmacol* 313(1–2):135–143. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00502-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00502-x)
- Hellstrom WJ, Smith W, Sikka SC (2005) Effects of alpha-blockers on ejaculatory function in normal subjects [abstract]. *J Urol* 173(Suppl):874
- Kalaczyc J (1998) Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. *Microsc Res Tech* 42(6):409–422. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980915\)42:6<409::AID-JEMT4%3e3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<409::AID-JEMT4%3e3.0.CO;2-H)
- Lepor H, Baumann M, Shapiro E (1988) The stereospecificity of LY253352 for alpha 1-adrenoceptor binding sites in the brain and prostate. *Br J Pharmacol* 95:139–144. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb16557.x>
- Lima AT, Amorim AC, Britto-Júnior J, Campitelli RR, Fregonesi A, Mônica FZ, Antunes E, De Nucci G (2022)  $\beta 1$ - and  $\beta 1/2$ -adrenergic receptor antagonists block 6-nitrodopamine-induced contractions of the rat isolated epididymal vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 395(10):1257–1268. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02268-6>
- Michel MC (2007) Alpha1-adrenoceptors and ejaculatory function. *Br J Pharmacol* 152:289–290. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707369>
- Motulsky H (2014) *Normality Tests. Intuitive Biostatistics: A Non-mathematical Guide to Statistical Thinking*. Oxford University Press, New York, NY, pp 203–208
- O'Leary MP (2001) Tamsulosin: current clinical experience. *Urology* 58(6 Suppl 1):42–8. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)01346-2](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01346-2). (discussion 48)
- Oliveira LFG, Britto-Júnior J, Lima AT, Moraes MO, Moraes MEA, de Souza VB, Schenka AA, Zakia Monica F, De Nucci G (2023) Release of 6-nitrodopamine from human popliteal artery and vein. *Life Sci* 1(326):121801. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121801>
- Owman C, Sjostrand NO (1965) Short adrenergic neurons and catecholamine-containing cells in vas deferens and accessory male genital glands of different mammals. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 8(66):300–320. <https://doi.org/10.1007/BF00344342>
- Ramsay JW, Scott GI, Whitfield HN (1988) A double-blind controlled trial of a new alpha-1 blocking drug in the treatment of bladder outflow obstruction. *Br J Urol* 57:657–659. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1985.tb07026.x>
- Roehrborn CG, Schwinn DA (2004) Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign

- prostatic hyperplasia. *J Urol* 171:1029–1035. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000097026.43866.cc>
- Rogers MD, Koletis PN (2013) Vasectomy. *Urol Clin North Am* 40:559–568
- Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A (2007) Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol* 152:332–340. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707366>
- Shibata K, Foglar R, Horie K, Obika K, Sakamoto A, Ogawa S, Tsujimoto G (1995) KMD-3213, a novel, potent, alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist: characterization using recombinant human alpha 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol* 48:250–258
- Tatemichi S, Kobayashi K, Maezawa A, Kobayashi M, Yamazaki Y, Shibata N (2006) Alpha1-adrenoceptor subtype selectivity and organ specificity of silodosin (KMD-3213). *Yakugaku Zasshi* 126:209–216. <https://doi.org/10.1248/yakushi.126.209>. (Japanese)
- U'Prichard DC, Charness ME, Robertson D, Snyder SH (1978) Prazosin: differential affinities for two populations of alpha-noradrenergic receptor binding sites. *Eur J Pharmacol* 1(50):87–89. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90258-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90258-3)
- van Dijk MM, de la Rosette JJ, Michel MC (2006) Effects of alpha(1)-adrenoceptor antagonists on male sexual function. *Drugs* 66:287–301
- Vicentic A, Robeva A, Rogge G, Uberti M, Minneman KP (2002) Biochemistry and pharmacology of epitope-tagged alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1):58–65. <https://doi.org/10.1124/jpet.302.1.58>
- Walden PD, Gerardi C, Lepor H (1999) Localization and expression of the alpha1A-1, alpha1B and alpha1D-adrenoceptors in hyperplastic and non-hyperplastic human prostate. *J Urol* 161:635–40
- Wilt TJ, MacDonald R (2006) Doxazosin in the treatment of benign prostatic hypertrophy: an update. *Clin Interv Aging* 1:389–401. <https://doi.org/10.2147/cia.2006.1.4.389>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.