

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Novo Candidato a Protótipo de Fármaco Antagonista Dual
de Adrenoceptores Alfa_{1AD} e Receptores 5-HT_{1A} para o
Tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna

FERNANDA CHAGAS DA SILVA DOS SANTOS

RIO DE JANEIRO

2014

**Novo Candidato a Protótipo de Fármaco Antagonista Dual de
Adrenoceptores Alfa_{1A/D} e Receptores 5-HT_{1A} para o Tratamento da
Hiperplasia Prostática Benigna**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia)

Orientadores: Dra. Claudia Lúcia Martins da Silva
Dr. François Germain Noël

Rio de Janeiro
Agosto/2014

Santos, Fernanda Chagas Silva

Novo Candidato a Protótipo de Fármaco Antagonista Dual de Adrenoceptores Alfa_{1A/D} e Receptores 5-HT_{1A} para o Tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna

/ Fernanda Chagas da Silva dos Santos. -Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2014. xiii, 93f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Claudia Lúcia Martins da Silva e François Germain Noël

1. receptor metabotrópico 2. adrenoceptor. 3. receptor 5-HT_{1A}. 4. antagonista. 5. Fenilpiperazinas. I. Silva, Cláudia Lúcia Martins da (Orient.) e Noël, François Germain (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

Dedico este trabalho

A Deus, toda honra e toda glória.

Aos meus pais e minha irmã, família linda, pelas palavras amorosas que me transmitiram força e coragem.

Ao meu esposo, Daniel Lucas, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e compreensão ao longo desta jornada.

Vocês são a minha fortaleza.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

“A riqueza e qualidade de um trabalho é fruto da combinação de um conjunto de pessoas, cada qual com sua parcela de contribuição.”

À prof^a **Claudia Lucia Martins da Silva**, minha orientadora, pessoa admirável. Obrigada por todo ensinamento, pela oportunidade, pela paciência, pelas conversas agradáveis e palavras incentivadoras, pelo carinho e compreensão. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Ao prof^o **François Germain Noël**, meu orientador, pela atenção, sabedoria e ensinamentos, pelo carinho e compreensão. O senhor também foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Ao prof^o **Luis Eduardo M. Quintas**, sempre disposto a ajudar, pelas sugestões e contribuições durante esses quatro anos.

Ao prof^o **Luis Antonio Soares Romeiro** e ao laboratório LADETER, pela colaboração e disponibilização das substâncias.

Ao prof^o **Luiz Eurico Nasciutti** e ao **Dr. Pedro A.V. Reis de Souza**, pela colaboração e pela doação de células de pacientes com HPB.

À doutoranda **Jessica B. N. Viana**, à mestranda **Aline Reis de Carvalho** e à aluna de iniciação científica, **Thaís S. Senna**, pela contribuição neste trabalho, pelo compartilhamento de conhecimentos e pela amizade.

Aos técnicos do laboratório, **Orlando R. Moreira** e **José F. Oliveira**, pela colaboração, pelos ensinamentos e pela amizade.

À família LFBM que deixou o dia-a-dia mais feliz e agradável, uma amizade pra vida inteira, **Suellen D’Arc**, **Thais Pompeu**, **Luciana Amaral**, **Natasha Paixão**, **Tassya Cataldi** e **Geraldino Cunha Filho**.

Aos professores **André S. Pupo**, **Lucienne S. L. Morcillo**, **Luiz E. Nasciutti**, **Newton G. Castro**, por aceitarem o convite para avaliação deste presente trabalho e pelas contribuições que não de fazer.

A prof^a **Gilda Angela Neves**, pela transmissão de conhecimentos em experimentação e manuseio de camundongos *in vivo*.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Farmacologia e Química Medicinal, pelas instruções e pelos ensinamentos transmitidos.

À **família Chagas, Silva, Santos e Paz**, pelo amor, pela torcida e compreensão pelas minhas ausências justificáveis.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a mim concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo suporte financeiro.

RESUMO

SANTOS, FERNANDA CHAGAS DA SILVA. **Novo Candidato a Protótipo de Fármaco Antagonista Dual de Adrenoceptores Alfa_{1A/D} e Receptores 5-HT_{1A} para o Tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna**. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado Em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma doença relacionada com o desequilíbrio entre crescimento celular e apoptose que contribui para o desenvolvimento de sintomas do trato urinário inferior (STUI). O principal tratamento farmacológico baseia-se no uso de antagonista de α_{1A} -adrenoceptores, porém a monoterapia falha em alguns casos. Estudos recentes da fisiopatologia da próstata identificaram o papel de α_{1D} -adrenoceptores e receptores 5-HT_{1A} na proliferação celular em adição ao papel de α_{1A} -adrenoceptores na contração da próstata. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar as características farmacológicas de quatro derivados *N*-fenilpiperazínicos (LDT65, LDT66, LDT67 e LDT68) que possuem alta afinidade para α_{1A} - e α_{1D} -adrenoceptores e receptores 5-HT_{1A}. Em ensaios funcionais em próstata e aorta de rato o LDT66 reduziu as contrações induzidas por fenilefrina com valores de K_B de 3,4 e 2,2 nM para α_{1A} - e α_{1D} -adrenoceptores, respectivamente. *In vivo* LDT66 (0,1 μ g/Kg) inibiu o aumento da pressão intrauretral, com pouco efeito hipotensor mesmo em dose maior (100 μ g/Kg). Em ensaios de *binding* funcional, LDT66 mostrou alta afinidade (faixa nanomolar) para os receptores 5-HT_{1A}, comportando-se como um antagonista. *In vitro*, LDT66 (50 nM) bloqueou o crescimento de células prostáticas humanas mediado tanto por fenilefrina via α_{1D} -adrenoceptor quanto por 5-HT via receptor 5-HT_{1A}. LDT66 tem baixa afinidade (faixa micromolar) para os receptores não alvos da HPB, tais como muscarínicos, α_{2A} - e α_{1B} -adrenoceptores. Em conclusão, LDT66 é um antagonista multialvo de alta afinidade de receptores relevantes para a HPB, sendo um candidato a protótipo de fármaco multialvo para o tratamento da HPB e STUI.

ABSTRACT

SANTOS, FERNANDA CHAGAS DA SILVA. **Novo Candidato a Protótipo de Fármaco Antagonista Dual de Adrenocetores Alfa_{1A/D} e Receptores 5-HT_{1A} para o Tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna**. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado Em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a progressive disease related to the imbalance of cell growth and apoptosis, and it plays a key role in the development of lower urinary tract symptoms (LUTS). The main pharmacological treatment is based on α_{1A} -adrenoceptor blockers, but in several cases monotherapy has failed. Recent studies of prostate pathophysiology have noted the role of α_{1D} -adrenocetores and 5-HT_{1A} receptors in prostate cell proliferation in addition to the usual role of α_{1A} -adrenocetores in prostate contraction. Therefore, the present work aimed to investigate the pharmacological characteristics of four *N*-phenylpiperazine derivatives (LDT series, LDT65–LDT68), which have selective affinity for $\alpha_{1A/D}$ -adrenocetores and 5-HT_{1A} receptors. Functional assays with rat prostate and aorta demonstrated that LDT66 reduced phenylephrine-induced contractions and showed K_B values of 3.4 and 2.2 nM for α_{1A} - and α_{1D} -adrenocetores, respectively. In functional binding assays, LDT66 showed a high affinity (nanomolar range) for the 5-HT_{1A} receptors, behaving as an antagonist. Culture of human prostatic cells characterized the α_{1D} -adrenocetores and 5-HT_{1A} receptor-mediated cell growth by phenylephrine and 5-HT, respectively, and LDT66 (50 nM) prevented both effects similarly. LDT66 also showed a low affinity (micromolar range) for receptors unrelated to BPH such as, α_{2A} -adrenocetores, muscarinic, which is a desirable profile in order to prevent putative side effects. Accordingly, LDT66 (100 μ g/kg) showed a marginal hypotensive effect. In conclusion, LDT66 is a high-affinity multi-target antagonist of relevant receptors for BPH, and it may be a new candidate to lead compound for multi-target drug to treat BPH and LUTS.

ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AP-1	Proteína ativadora 1
α_1-AR	α_1 -Adrenoceptor
CaMK I	Proteína Cinase II Dependente de Cálcio/Calmodulina
CE₅₀	Concentração em que se alcança 50% do efeito máximo
CI₅₀	Concentração em que se inibe 50% do efeito máximo
CPM	Contagem Por Minuto
CR	do inglês <i>Concentration Ratio</i> (razão de concentração)
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
DAG	Diacilglicerol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EL	Eficiência do Ligante
ERK	do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i> , cinase regulada por sinal extracelular
FE	Fenilefrina
g_{av}	Força de gravidade média
GPCR	do inglês <i>G protein coupled receptor</i> (receptor acoplado à proteína G)
GTP	trifosfato de guanosina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IP₃	Inositol (1, 4, 5) Trifosfato
K_B	Constante de equilíbrio de dissociação de um antagonista determinada em ensaio funcional
Kd	Constante de equilíbrio de dissociação de um ligante determinada em ensaio de ligação
K_i	Constante de equilíbrio de dissociação de um ligante determinado em ensaio de competição
LADETER	Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
MAPK	do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i> , proteína cinase ativada por mitógeno
mN	miliNewton

MLC	do inglês <i>myosin light-chain</i> , Cadeia Leve da Miosina
NE	Neuroendócrina
PAM	Pressão Arterial Média
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipases C
PZS	Prazosina
RPM	Revoluções por minuto
RO5	do inglês <i>Rule Of 5</i> (regra dos 5)
SNC	Sistema Nervoso Central
TM	Transmembranares
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	2
1.1.1 Anatomia da próstata e HPB.....	3
1.1.2 Etiologia da HPB.....	5
1.2. Adrenoceptores e sinalização no trato urinário inferior.....	6
1.3 Tratamento farmacológico da HPB sintomática.....	7
1.3.1 Evolução de antagonistas α_1 -AR no tratamento da HPB.....	9
1.4 Nova via de sinalização celular relevante da HPB: receptores 5-HT _{1A} ... 13	
1.5 Estrutura privilegiada.....	14
1.5.1 Caracterização farmacológica de derivados <i>N</i> -fenilpiperazínicos candidatos a protótipo no tratamento da HPB.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Material & Métodos	19
3.1 Obtenção dos derivados <i>N</i> -fenilpiperazínicos.....	20
3.2. Avaliação teórica das propriedades moleculares dos LDT65 – LDT68.20	
3.2.1 Regra dos 5 (RO5).....	20
3.2.2 Eficiência do Ligante.....	21
3.3 Obtenção dos órgãos de animais.....	21
3.4. Preparações Membranares.....	22
3.4.1 α_2 -adrenoceptores e receptores muscarínicos nativos.....	22
3.4.2 Receptores <i>D</i> ₂ -like nativos.....	22
3.4.3 Receptores 5-HT _{1A} nativos.....	25
3.5 Dosagem de proteínas.....	27
3.6 Ensaio de binding.....	27
3.6.1 α_2 -adrenoceptores (α_2 -AR).....	27
3.6.2 Receptores muscarínicos.....	30
3.6.3 Receptores <i>D</i> ₂ -like.....	30
3.6.4 Receptores 5-HT _{1A}	31
3.7 Atividade intrínseca nos receptores 5-HT _{1A}	31
3.7.1 Razão de valores de K_i	31
3.7.2 Ensaio de binding do [³⁵ S]-GTP γ S.....	32
3.8 Ensaio Funcionais.....	32
3.8.1 Aorta de rato	32
3.8.2 Próstata de rato	32

3.9	Cultura de células humanas.....	33
3.10	Ensaio de proliferação <i>in vitro</i>	33
3.10.1	Avaliação da proliferação celular.....	34
3.10.2	Quantificação celular.....	34
3.11	Ensaio <i>in vivo</i>	35
3.11.1	Pressão arterial (PAM).....	35
3.11.2	Pressão intra-uretral.....	35
3.12	Avaliação do efeito dos LDTs sobre a temperatura corporal e comportamento.....	36
3.13	Análise dos dados e tratamento estatístico.....	37
3.14	Listagem de reagentes.....	37
4.	Resultados	38
4.1	Avaliação do potencial <i>drug-likeness</i> dos LDT65 – LDT68 a partir de propriedades físico-químicas e farmacológicas.....	39
4.1.1	Regra dos 5 de Lipinski.....	39
4.1.2	Eficiência do Ligante.....	39
4.2	Determinação da afinidade dos LDT65 – LDT68 pelos α_{2A} -adrenoceptores, <i>D₂-like</i> e muscarínicos.....	40
4.2.1	Inibição da ligação da [³ H]RX821002 aos α_{2A} -adrenoceptores.....	40
4.2.2	Inibição da ligação da [³ H]-YM-09151-2 aos receptores <i>D₂-like</i>	41
4.2.3	Inibição da ligação da [³ H]QNB a receptores muscarínicos.....	43
4.3	Avaliação da atividade intrínseca dos LDTs nos receptores 5-HT _{1A}	44
4.4	Determinação da afinidade e atividade intrínseca do derivado LDT66 pelos α_{1D} -AR e α_{1A} -AR.....	46
4.4.1	α_{1D} -Adrenoceptores.....	47
4.4.2	α_{1A} -Adrenoceptores.....	49
4.5	Ensaio <i>in vivo</i>	51
4.5.1	Efeito do derivado LDT66 sobre a pressão arterial de rato.....	51
4.5.2	Efeito do derivado LDT66 sobre a pressão intra-uretral elevada.....	52
4.5.3	Avaliação do LDT66 sobre temperatura corporal e comportamento.....	53
4.6	Efeito do LDT66 sobre o crescimento de células prostáticas humanas.....	56
5.	Discussão	60
6.	Conclusões	70
7.	Referências	72

ANEXO 1

1. Introdução

1.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A próstata é uma glândula acessória exclusiva dos mamíferos e é essencial para o sistema reprodutivo masculino, sendo responsável pela produção, armazenamento e secreção da porção líquida do sêmen na ejaculação (Burden et al., 2006). Situa-se logo abaixo da bexiga, circundando o colo vesical e a uretra proximal, exercendo o principal mecanismo de continência urinária masculina (Zaichick, 2014).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma neoplasia benigna da glândula prostática altamente prevalente e sua incidência aumenta em cada década a partir dos 40 anos, atingindo o pico aos 80-90 anos de vida dos homens (Ricke et al., 2011).

O aumento progressivo da próstata pode levar à obstrução ao esvaziamento da bexiga, através da constrição da uretra proximal (Figura 1), e conseqüentemente aos sintomas do trato urinário inferior (STUI). Cerca de 50% dos pacientes idosos com HPB histológica apresentam STUI moderados a severos, os quais apresentam um impacto negativo sobre a qualidade de vida (Roehrborn e Rosen, 2008). Os STUI podem ser obstrutivos, caracterizados por jato fraco e intermitente com volume residual de urina na bexiga, ou de armazenamento e irritativos, tais como noctúria, urgência, aumento da frequência urinária (McNeal, 1990; Roehrborn, 2011; Nicholson e Ricke, 2011; Osman et al., 2014).

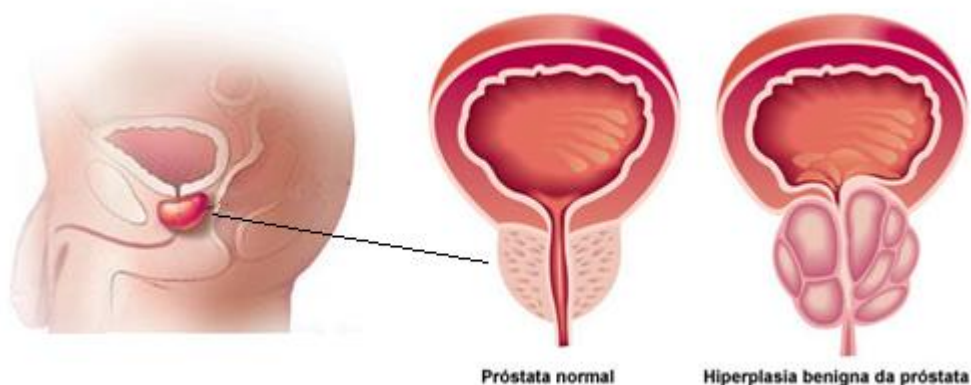


Figura 1: Ilustração de uma próstata normal e hiperplásica.

www.criasaude.com.br/N3788/doencas/hiperplasia-benigna-da-prostata-hpb.html e urologiaperuana.blogspot.com.br/2009/05/hiperplasia-benigan-de-la-prostata.html

Acesso em: 04/05/2014.

1.1.1 Anatomia da próstata e HPB

A próstata normal é composta por ductos ramificados imersos em um estroma contendo majoritariamente músculo liso (dentre outros tipos celulares como fibroblastos, miofibroblastos e células neuronais, linfáticas e vasculares), e uma membrana basal envolvente formada por uma camada de matriz extracelular, a qual tem a função de preservar a integridade tecidual da glândula (Marker et al., 2003; Gandellini et al., 2012). Os ductos são constituídos por epitélio estratificado, o qual é caracterizado por três tipos celulares: uma camada interna de células colunares altas que secretam para o lúmen da glândula, uma camada externa, de células cubóides independentes de andrógeno formando uma camada basal subjacente à membrana basal e uma menor população de células neuroendócrinas (NE), enriquecidas em grânulos contendo a amina biogênica serotonina (5-HT) e uma variedade de peptídeos, as quais se localizam entre as células secretórias (Figura 2) (Signoreti e Loda, 2006; Nelson et al., 2007; Gandellini et al., 2012).

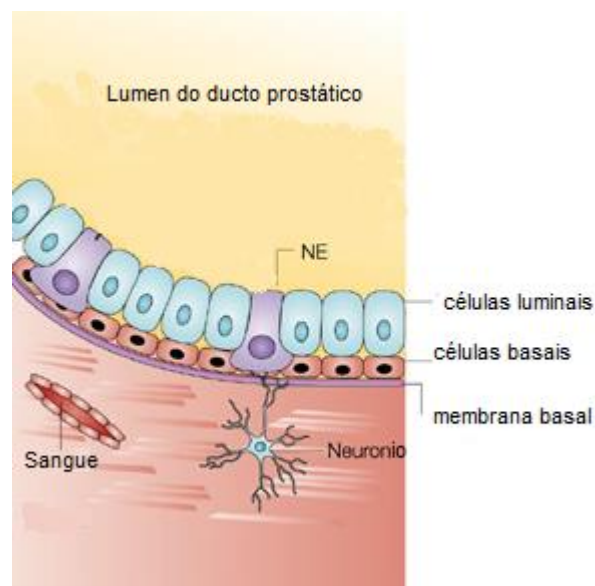


Figura 2: Ilustração das células que constituem o ducto imerso no estroma prostático. NE: células neuroendócrinas. Adaptado de Bok e Small, 2002.

Anatomicamente, a próstata pode ser dividida em três zonas distintas (Figura 3): zona de transição, zona periférica e zona central, as quais são identificadas por suas características histológicas, divisões anatômicas, funções biológicas, susceptibilidade a doenças e origens embriológicas

distintas e (McNeal, 1983; Lee et al., 2011). A zona de transição localiza-se ao redor da uretra proximal, correspondendo a 5% da glândula e possui um estroma mais denso com fibras musculares lisas entrelaçadas. O remodelamento prostático característico da HPB se desenvolve nesta zona predominantemente através de nódulos hiperplásicos contendo elementos principalmente do estroma (Roy-Burman et al., 2004; Alonso-Magdalena et al., 2009; Bushman et al., 2009; Lee et al., 2011). Assim sendo, a razão estroma:epitélio é aumentada durante a HPB sintomática (5:1 vs 2:1 na ausência da hiperplasia) (McNeal et al., 1990; apud Shapiro et al., 1992; Kyprianou et al., 2003). Esta localização anatômica é a razão pela qual a HPB está associada a sintomas obstrutivos e pode explicar os sintomas severos frequentemente observados com apenas um pequeno grau de aumento da próstata (Tannenbaum et al., 1983; apud Hieble e Ruffolo, 1996).

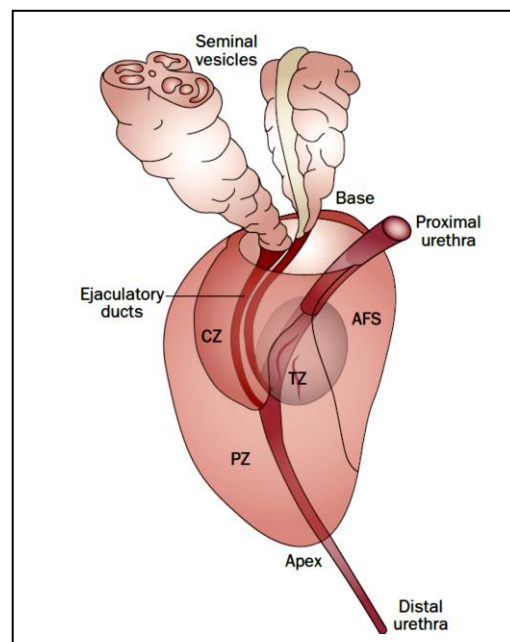


Figura 3: Visão anterior da próstata e uretra. A próstata é dividida em três zonas: a zona central (CZ), a zona de transição (ZT) e a zona periférica (PZ). As vesículas seminais e ductos ejaculatórios estão localizados na base da próstata. O estroma fibromuscular anterior (AFS) está localizado anteriormente. Retirada de: Wadhera, 2013

1.1.2 Etiologia da HPB

Os mecanismos moleculares exatos que levam a indução, manutenção e ao desenvolvimento dos sinais clínicos resultantes da HPB são multifatoriais e ainda não conhecidos completamente. No entanto, sabe-se que a ocorrência de HPB é dependente de andrógenos circulantes, como a testosterona e principalmente de seu metabólito ativo 5α -reduzido, a di-hidrotestosterona (DHT), os quais são importantes no desenvolvimento e crescimento normal da próstata (Carson e Rittmaster, 2003). Por exemplo, homens castrados antes da puberdade não desenvolvem HPB (Wilson e Roehrborn, 1999; Timms e Hofkamp, 2011). Ademais, alguns estudos têm mostrado que a DHT causa a proliferação excessiva de elementos do epitélio glandular e de miofibroblastos da zona de transição, além da inibição de apoptose, resultando no aumento do volume próstático (Carson e Rittmaster, 2003; Priest et al., 2012). Entretanto, sabe-se que o crescimento da próstata não está diretamente correlacionado aos níveis da DHT, o que sugere que além do andrógeno, outros fatores também podem ser responsáveis pelo aumento da glândula (Lepor et al., 2004), tais como fatores de crescimento, estresse oxidativo, poluentes ambientais, inflamação, hereditariedade e a interação entre o epitélio e estroma da próstata (Bostanci et al., 2013, Barclay et al., 2005; Harman et al., 2001; Nickel et al., 1999; Prajapati et al., 2013).

Recentemente, alguns estudos têm investigado a participação do α_{1D} -adrenoceptor (α_{1D} -AR) na regulação da proliferação celular, inclusive na próstata, onde foi mostrado que a ativação dos α_{1D} -AR induz a proliferação celular ao nível de estroma, epitélio e musculatura lisa, tanto em ratos como em humanos, e seu bloqueio previne este efeito (Kojima et al., 2009). E, no trato urinário inferior, o aumento da expressão de α_{1D} -AR se correlaciona com a hipertrofia da bexiga (Hampel et al., 2002).

1.2 Adrenoceptores e sinalização no trato urinário inferior

Os α_1 -AR são receptores amplamente distribuídos no cérebro e órgãos periféricos (Hieble, 2000; Michelotti et al., 2000), presentes na musculatura lisa vascular e não vascular. Eles se apresentam em três subtipos distintos denominados α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} (Ford et al., 1994; Hieble et al., 1995; IUPHAR Receptor Database; www.iuphar.org; acesso em maio 2014). Os α_1 -AR são receptores metabotrópicos pertencentes à família rodopsina de receptores acoplados à proteína G (em inglês: *G protein coupled receptors – GPCR*) heterotrimérica, composta de três subunidades associadas (α , β , e γ). De acordo com características filogenéticas, esta família é subdividida em quatro grupos principais (α , β , γ e δ) que compreendem treze ramos distintos, dos quais cinco ramos pertencem ao grupo α com 101 membros. Os α_1 -AR, particularmente, fazem parte do grupo de receptores de aminas biogênicas inclusos no grupo α , onde se encontra a maioria dos receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos e muscarínicos) (Fredriksson et al., 2003).

A função fisiológica clássica mediada por estes receptores é a contração da musculatura lisa vascular e não vascular, além do envolvimento na hipertrofia cardíaca, proliferação de células do músculo liso vascular, hepatócitos e próstata (Rokosh et al., 1996; Zhong e Minneman, 1999; Michelotti et al., 2000; Piascik e Perez, 2001; Kojima et al., 2009).

Os mecanismos celulares envolvidos na contração, hipertrofia e proliferação celular do músculo liso no trato urinário inferior via $\alpha_{1A/D}$ -AR já foram, em parte, estabelecidos. Inicialmente, na presença do ligante endógeno (noradrenalina e adrenalina) ou de um agonista externo, os $\alpha_{1A/D}$ -AR são ativados causando a dissociação da proteína G_q , gerando as subunidades α e $\beta\gamma$. Subsequentemente, a subunidade α_{G_q} ativa a fosfolipase $C\beta$ (PLC- $\beta 1$) e a GTPase monomérica RhoA (Hennenberg e Gratzke, 2013). A PLC- $\beta 1$ hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) da membrana formando os segundos mensageiros inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ causa a abertura dos canais de Ca^{2+} presentes no retículo endo/sarcoplasmático aumentando a concentração de Ca^{2+} citosólica. Há despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L, havendo uma corrente massiva de Ca^{2+} do meio extracelular para o interior da

célula. Com relação à contração, o aumento de Ca^{2+} intracelular leva à ativação da calmodulina e da proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK II), a qual fosforila um resíduo serina na cadeia leve da miosina (MCL), favorecendo a interação actina-miosina (apud Minneman, 1988; Wu et al., 1992; Docherty, 2010). Paralelamente, o DAG estimula as isoformas da proteína cinase C (PKC), dependente ou não de Ca^{2+} , que causam a inibição da fosfatase de MCL através da fosforilação da subunidade regulatória, ocorrendo sensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} , o que resulta em uma maior fosforilação da MCL e contração. Este último mecanismo é compartilhado pela via da RhoA/Rho cinase (Rees et al., 2003; Somlyo e Somlyo, 2003; Christ e Andersson, 2007; Hennenberg et al., 2013).

Além da contratilidade, a via da Rho cinase também está envolvida na proliferação das células prostáticas humanas, já que inibidores desta via diminuíram a proliferação celular em cultura de células estromais prostáticas (Rees et al., 2003; Ventura et al., 2011). Todas as vias canônicas citadas acima podem culminar na via de ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) também conhecidas como proteínas cinases ativadas por sinais extracelulares (ERK 1/2). Estas proteínas comunicam sinais extracelulares ao núcleo através da ativação de uma série de proteínas cinases proto-oncogênicas (Hu et al., 1999b; Gentili et al., 2002; Kubo et al., 2005). Durante a cascata de sinalização pode haver fosforilação dos fatores de transcrição c-Fos e c-Jun, que formam o dímero conhecido como fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), o qual aumenta a transcrição de diversos genes envolvidos na hipertrofia e proliferação celular (Della et al., 1997; Hu et al., 1999a e 1999b; Garcia-Sainz et al., 1999).

1.3 Tratamento farmacológico da HPB sintomática

A HPB é caracterizada pelos componentes dinâmico e estático, os quais contribuem para os STUI. O componente dinâmico reflete o aumento do tônus da musculatura lisa do colo da bexiga, da próstata e uretra. Este tônus é regulado pelo sistema nervoso simpático e mediado principalmente pelos α_1 -adrenoceptores (α_1 -AR), os quais estão localizados predominantemente no estroma prostático (apud Hedlund et al., 1985; apud Hieble et al., 1985;

Chapple et al., 1989; Marshall et al., 1995; Pulito et al., 2000; Thiyagarajan et al., 2002; Nanda et al., 2009). Entre os diferentes subtipos de adrenoceptores, os α_{1A} -AR são predominantes no músculo liso da próstata e da uretra, onde induzem contração. Na HPB há um aumento da expressão de α_{1A} -AR e conseqüentemente um *up regulation* desta via (Testa et al., 1993; Forray et al., 1994; Nasu et al., 1996, Maruyama et al., 1998; Michelotti et al., 2000; Michel e Vrydag, 2006).

Por outro lado, o α_{1D} -AR também está presente na próstata e é o subtipo predominante na bexiga, correspondendo ao dobro da densidade de α_{1A} -AR (Malloy et al., 1998). A expressão dos α_{1D} -AR, assim como para os α_{1A} -AR, é aumentada durante a HPB o que contribui para a proliferação celular da próstata (Nasu et al., 1996, Nishino et al., 2006; Kojima et al., 2006). E na bexiga, este aumento contribui para os sintomas irritativos decorrentes da obstrução ao esvaziamento da bexiga e, possivelmente, para os sintomas associados à hipertrofia do músculo detrusor, como o aumento do tônus, diminuindo a complacência (Hampel et al., 2002, Ishizuka et al., 2013).

É necessário que o paciente tenha um tratamento farmacológico eficaz na medida em que a ausência ou inadequação deste pode acarretar complicações como a retenção urinária aguda, incontinência urinária, insuficiência renal crônica, infecção do trato urinário, lesão vesical funcional e anatômica, presença de cálculos na bexiga e falha renal (Fine e Ginsberg, 2008; Speakman e Cheng, 2014).

O objetivo do tratamento com antagonistas dos α_1 -AR é o alívio dos STUI, o qual é exercido através do relaxamento dos músculos lisos do colo da bexiga, da uretra e da próstata, com conseqüente aumento do fluxo urinário e esvaziamento da bexiga, reduzindo a necessidade de procedimentos cirúrgicos.

Os dados clínicos atuais indicam que os antagonistas com maior afinidade por α_{1A} -AR ou α_{1AD} -AR são os fármacos mais eficazes, sendo de primeira escolha para o tratamento da HPB moderada a severa (Nickel, 2006; Ito et al., 2006; Hieble, 2011; Hennenberg et al., 2014).

Por outro lado, o componente estático está relacionado com a massa de tecido hiperplásico da próstata que comprime fisicamente a uretra e obstrui a

saída da urina da bexiga, fator diretamente dependente da testosterona e da DHT (Kenny, 1996; Tiwari et al., 2005). Deste modo, inibidores da enzima 5 α -redutase, os quais impedem a conversão da testosterona a DHT (exemplos: finasterida e dutasterida), são utilizados na clínica por produzir atrofia da próstata (Carson et al., 2003) através de seu efeito apoptótico sobre o epitélio dependente de andrógeno (Untergasser et al., 2005).

Entretanto, a eficácia da associação de inibidores da 5- α redutase com os antagonistas α_1 -AR em relação a monoterapia (antagonistas α_1 -AR) ainda é alvo de discussão na literatura (McConnell et al., 2003; Kirby et al., 2003; Lepor et al., 1996). Um estudo com 1229 pacientes com HPB revelou que a eficácia da associação de finasterida e terazosina (inibidor da 5- α redutase e antagonista α_1 -AR, respectivamente) não foi superior à monoterapia com terazosina (Lepor et al., 1996), porém outros estudos tiveram conclusões diferentes (McConnell et al., 2003, Kirby et al., 2003). Contudo, os inibidores da 5 α -redutase não relaxam a próstata e levam de seis a doze meses para agir, ao contrário dos antagonistas α_1 -AR que possuem ação entre horas a semanas (Ventura et al., 2011; Priest et al., 2012; Hennenberg et al., 2013). Também apresentam maior redução da libido e disfunção sexual se comparado ao antagonista α_1 -AR (McConnell et al., 2003, Kirby et al., 2003, Lepor et al., 1996). Alguns dados sugerem que o uso crônico de finasterida poderia causar uma diferenciação das células neuroendócrinas, o que seria desfavorável para pacientes com risco de câncer prostático (Tarle et al., 2009).

1.3.1 Evolução de antagonistas α_1 -AR no tratamento da HPB

O tratamento dos STUI secundários à HPB moderada à severa com antagonistas α_1 -AR (Figura 4) é considerado padrão ouro na clínica. Baseado em escore de sintomas prostáticos e urodinâmica obtidas em estudos controlados e abertos foi as Associações Americana e Européia de Urologia consideram o uso de antagonistas α_1 -AR como uma alternativa eficaz e apropriada (Mc Vary et al., 2011; Oelke et al., 2013).

Os antagonistas α -AR foram introduzidos a partir de 1978 através da fenoxibenzamina, antagonista α -AR não seletivo e irreversível. Entretanto, a fenoxibenzamina é um fármaco obsoleto devido aos efeitos adversos como a

hipotensão arterial, cansaço, tontura, congestão nasal e ejaculação prejudicada, além de ser potencialmente carcinogênico (Lepor, 1990 e 2007; Fischer et al., 2003). Em seguida, com melhor conhecimento da farmacologia dos α_1 -AR, surgiram outras gerações de antagonistas α -AR.

A prazosina, derivado quinazolinico de segunda geração, foi o primeiro antagonista seletivo para α_1 -AR utilizado para o tratamento da HPB. A prazosina possui afinidade alta (subnanomolar) e semelhante para os três subtipos de α_1 -AR e baixa para α_{1L} -AR, fenótipo funcional do subtipo α_{1A} -AR (Flavahan & Vanhoute, 1986 apud Hiraoka, 2003; Muramatsu et al., 1990 e 1998). Porém a hipotensão postural permaneceu como um dos efeitos adversos, a qual pode ser mais pronunciada no paciente idoso, uma vez que a expressão dos subtipos α_{1B} -AR, os quais medeiam contração do músculo liso dos vasos de resistência, aumenta no envelhecimento (Rudner et al., 1999; Lepor, 2007).

A terazosina e a doxazosina análogos estruturais da prazosina, porém menos potente, foram o primeiro e segundo, respectivamente, antagonistas α_1 -AR de longa duração aprovados para o tratamento da HPB sintomática moderada à severa, sendo eficazes como monoterapia (Kaplan et al., 2005; Lepor et al., 2012).

A terceira geração abrange fármacos com alta afinidade para os receptores α_{1A} -AR presentes em abundância na próstata, como a tamsulosina (derivados feniletilaminínicos), cuja dose não necessita ser titulada (Narayan et al., 1998; Lepor et al., 2012) e a alfuzosina (derivado quinazolinico), que embora não seletiva, possui tolerabilidade cardiovascular semelhante à tamsulosina (Michel et al., 2010). A tamsulosina também possui alta afinidade pelos α_{1D} -AR e apresenta baixa incidência de hipotensão como efeito adverso vascular, em razão da sua seletividade em relação ao α_{1B} -AR (afinidade 14 vezes maior para α_{1A} do que para α_{1B} -AR) (Leonardi et al., 1997; Nanda et al., 2009).

A silodosina, derivado trifluoroetoxi-fenoxietilamina, recentemente aprovada nos EUA e Europa, é um fármaco com seletividade para o subtipo α_{1A} -AR superior à tamsulosina (Cantrell et al., 2013), com afinidade 583 e 56 vezes maior do que α_{1B} -AR e α_{1D} -AR, respectivamente, e que possui um perfil cardiovascular seguro (Lepor e Hill, 2010; Lepor et al., 2012).

Atualmente, alfuzosina, doxazosina, tamsulosina e terazosina constituem a primeira linha de tratamento dos STUI secundários à HPB, pois são eficazes e de ação rápida além de não possuírem efeitos adversos significativos. Embora haja pequenas diferenças nos efeitos adversos entre os fármacos seletivos ou não para α_{1A} -AR, a eficácia no alívio dos sintomas obstrutivos é semelhante nas doses apropriadas (Yoo e Cho, 2012).

Com exceção de derivados quinazolínicos, os demais antagonistas α_{1A} -AR atuais não evitam o aumento do volume prostático. Contudo, o efeito antiproliferativo de derivados quinazolínicos independe dos α_1 -AR e os dados sugerem que há apoptose também no sistema cardiovascular o que seria deletério ao paciente (revisto em Kyprianou et al., 2009).

Um novo antagonista dos α_1 -AR com estrutura fenilpiperazínica e com maior afinidade dos α_{1D} -AR, o naftodipil, vem sendo usado no Japão para o tratamento dos sintomas da HPB (Michel, 2010; Hara et al., 2013; Hennenberg et al., 2014).

Kojima e colaboradores (2006) observaram que a eficácia da tamsulosina e naftopidil em pacientes com HPB diferiram dependendo do subtipo dominante de adrenoceptores (α_{1A} -AR ou α_{1D} -AR). O subtipo predominante dos α_1 -AR foi avaliado através de ensaios de RT-PCR realizados nas biopsias. Segundo os autores, a tamsulosina foi mais eficaz em pacientes com a expressão dominante do α_{1A} -AR, enquanto o naftopidil foi mais eficaz naqueles pacientes com expressão dominante do subtipo α_{1D} -AR. O nível de expressão do RNAm na próstata poderia ser considerado como um indicador na escolha do antagonista α_1 -AR, pois as diferenças genéticas podem ser responsáveis pela diversas respostas aos fármacos. Contudo, este procedimento apresenta uma limitação na aplicabilidade pela inconveniência de biópsia (Ishizu et al., 2013).

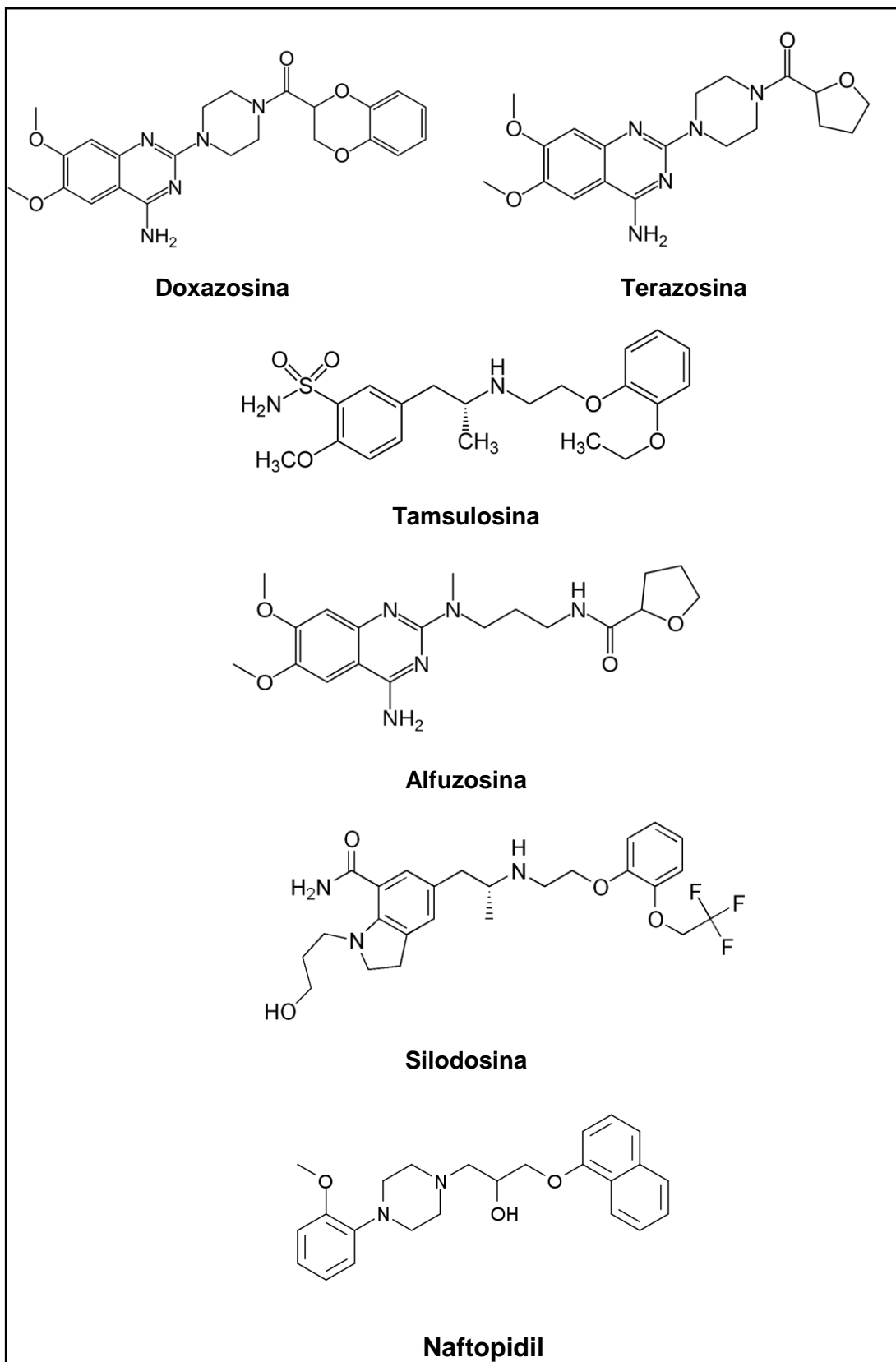


Figura 4: Antagonistas dos α_1 -ARs

1.4 Nova via de sinalização celular relevante da HPB: receptores 5-HT_{1A}

Os receptores serotoninérgicos são membros da família dos GPCRs (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄ – 5-HT₇, com exceção do subtipo 5-HT₃) (Raymond et al., 1999; Fredriksson et al., 2003; Pucadyil et al., 2006), que compartilham serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), como ligante endógeno.

O receptor 5-HT_{1A} é um receptor acoplado à proteína G_i/G₀ regulando os níveis intracelulares do AMPc e foi um dos primeiros receptores pertencentes à família de GPCRs a ter o gene clonado (Kobilka et al., 1987; Fargin et al., 1988). O RNAm do 5-HT_{1A} é expresso principalmente no cérebro, onde está presente em alta densidade no córtex cerebral, hipocampo, septo lateral, amígdala e no núcleo da rafe mesencefálica, e em baixa densidade no gânglio basal e tálamo (Ito et al., 1999; Burnet et al., 1995; De Almeida e Mengod, 2008). Os 5-HT_{1A} podem estar localizados no corpo celular, dendrito, axônio, pré-sinápticamente (autoreceptores) e pós-sinápticamente nos terminais nervosos ou sinapses. Esses receptores também são encontrados fora do SNC, como por exemplo, no baço, rins neonatal, intestino (Pucadyil e Chattopadhyay., 2006), mas são pouco expressos nas artérias coronárias, átrio, ventrículo e epicárdio (Nilsson et al., 1999). Este receptor também é expresso nas células neuroendócrinas prostáticas conforme observado tanto em biópsia de tecido de paciente com HPB como com câncer de próstata, sugerindo um efeito autócrino da 5-HT (Dizeyi et al., 2004). Estes receptores também estão presentes em linhagens de células tumorais de próstata tais como LNCaP, DU-145 e PC-3 (Dizeyi et al., 2004).

As células neuroendócrinas têm um papel relevante no crescimento e em sua própria diferenciação na próstata (di Santa'Agnese et al., 1994). Elas estão relacionadas com a patogênese da HPB, pois foi observada maior densidade destas células em pequenos nódulos em desenvolvimento e em ductos na zona de transição (Cockett et al., 1993; Islam et al., 2002). A 5-HT secretada por estas células regula a atividade proliferativa das células epiteliais e juntamente com outros fatores de crescimento estimula a mitogênese de fibroblastos e músculo liso observada no desenvolvimento da HPB (Cockett et al., 1993; Islam et al., 2002), além de ser reconhecida como fator de crescimento em vários tipos celulares (Dizeyi et al., 2004; Siddiqui et al., 2006). Esta amina biogênica estimula a proliferação de células epiteliais e, juntamente com outros fatores de

crescimento, também estimula a mitogênese de fibroblastos e do músculo liso (Cockett et al., 1993).

A sinalização não canônica dos receptores 5-HT_{1A}, assim como a via dos α_1 -AR, envolve a via de ativação de da ERK 1/2 (Dizeyi et al., 2011). Dados anteriores demonstraram que antagonistas seletivos para receptores 5-HT_{1A} (NAN-190 e WAY100135) têm um efeito inibitório sobre o crescimento de linhagens de câncer de próstata *in vitro* (PC3, DU145 e LNCaP) (Abdul et al., 1994 e 1995; Dizeyi et al., 2004 e 2005).

1.5. Estrutura privilegiada

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos são conhecidos por exibirem afinidade semelhante para α_1 -AR e receptores 5-HT_{1A}, tendo em vista do alto grau de homologia entre ambas as sequências de aminoácidos (Trump-Kallmeyer et al., 1992; Glennon et al., 1993; Fiorino et al., 2005), particularmente na região transmembranar hidrofóbica de reconhecimento de ligantes. Desta forma o arcabouço *N*-fenilpiperazínico pode ser considerado uma estrutura privilegiada (DeSimone et al., 2004). Estas estruturas possuem os requerimentos estruturais que se acomodam dentro do modelo farmacofórico conhecido para α_1 -AR, onde o átomo nitrogênio protonável na posição 4 (N4) da fenilpiperazina é essencial para a interação com o receptor (mais especificamente com resíduo aspartato em TMIII). A porção aromática ligada ao N1 é a segunda característica estrutural necessária para esta interação (figura 5) (de Marinis, 1997; Kenny et al., 1997; Menziani et al., 1999; Forray e Noble, 1999; Bremner et al., 2001; Manetti et al., 2002).

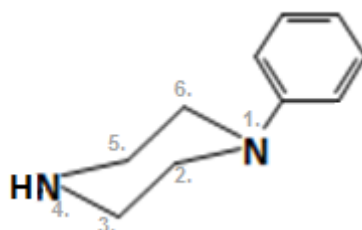


Figura 5: Grupo funcional *N*-fenilpiperazina

Durante o mestrado foram investigados 11 derivados *N*-fenilpiperazínicos, denominados de série LDTs (LDT62 – LDT70, LDT39 e 2-OH-FPz; depósito de patente INPI - 020120000647), sintetizados pelo professor Luiz Antonio Soares Romeiro (laboratório LADETER, Universidade Católica de Brasília). Estes derivados compartilham a estrutura *N*-fenilpiperazínico do BMY 7378, antagonista seletivo para os adrenoceptores α_{1D} , porém não utilizado clinicamente, e diferentes substituições em N4 (R1) e na posição orto do anel aromático (R2) (Figura 6).

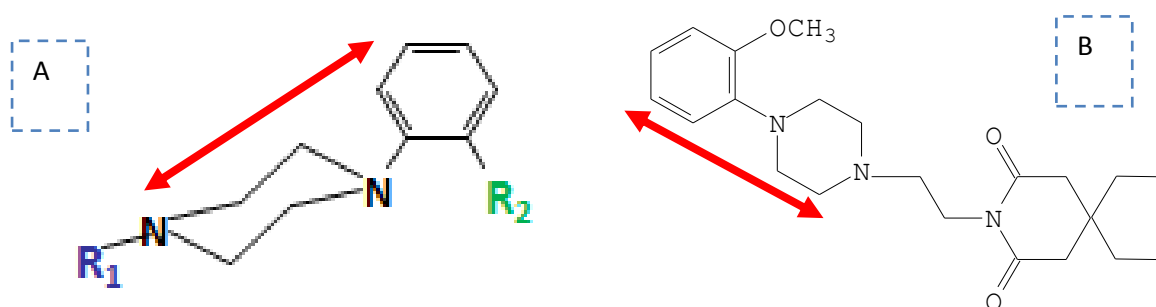


Figura 6: A) Estrutura *N*-fenilpiperazínica dos LDTs. R1 e R2 representam substituintes no N4 da piperazina e na posição 2 do anel aromático, respectivamente. A estrutura *N*-fenilpiperazínica é identificado pela seta vermelha. B) Estrutura química do BMY 7378. A porção 2-metóxi *N*-fenilpiperazínica é destacada em vermelho.

1.5.1 Caracterização farmacológica de derivados *N*-fenilpiperazínicos candidatos a protótipo no tratamento da HPB

Foram realizados estudos para caracterização farmacológica dos derivados *N*-fenilpiperazínicos através de ensaios funcionais em aorta de rato e de radioligação (*binding*) em preparações de fígado de coelho e rato, tecidos enriquecidos em α_{1D} -AR, α_{1A} -AR e α_{1B} -AR nativos, respectivamente, e outras preparações enriquecidas nos subtipos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}.

Dentre a série estudada, quatro derivados (LDT65, LDT66, LDT67 e LDT68) se destacaram por terem alta afinidade (faixa nM) para os $\alpha_{1A/D}$ -AR, e receptor 5-HT_{1A} (Chagas-Silva, 2010). Os valores de K_i e K_B calculados se encontram dentro da faixa de maior frequência de afinidade apresentada pelos fármacos em uso clínico, os quais apresentam afinidade na faixa nanomolar de concentração, com mediana de K_i em torno de 20 nM (figura 7).

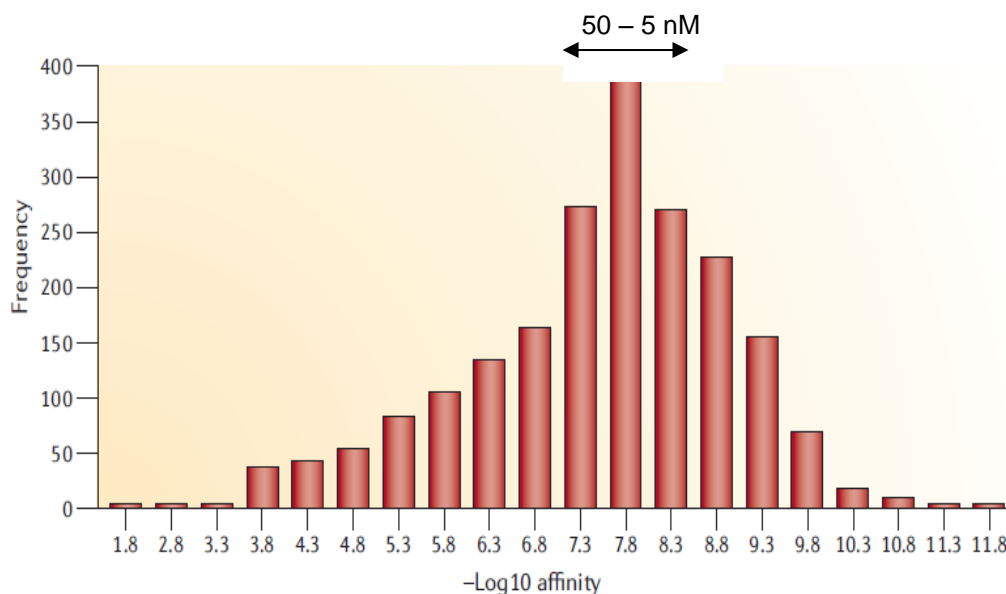


Figura 7: Frequência de distribuição dos valores do parâmetro de afinidade (K_i) em escala logarítmica dos fármacos utilizados clinicamente. A seta indica a faixa de maior frequência (K_i : 5 – 50 nM). Retirado de Overington et al., 2006.

Ademais, os derivados LDT65 – LDT68 tem boa adesão à regra de Lipinski ou “regra dos cinco de Lipinski”, a qual avalia se candidatos a protótipos teriam potencial atividade quando administrados por via oral (Lipinski et al., 1997).

No que diz respeito a seletividade frente a receptores não-alvos, os derivados LDT65 – LDT68 também foram destaques por apresentar baixa afinidade para os receptores 5-HT_{2A} (faixa μ M), reduzindo a probabilidade de possíveis efeitos adversos centrais em um possível uso clínico (Capela et al., 2006; Rowley et al., 2001). Além disto, também apresentaram afinidade na faixa μ M e uma ótima razão de seletividade (25 – 156 vezes) para α_{1D} -AR em relação ao α_{1B} -AR. Quando comparados à tamsulosina, a qual apresenta afinidade na faixa nM (Kuo et al., 2000), estes derivados apresentam menor afinidade por α_{1B} -AR.

Desta forma, estes novos compostos são considerados novos ligantes multialvos de α_1 -AR (α_{1A} e α_{1D}) e receptores 5-HT_{1A}.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar farmacologicamente quatro derivados *N*-fenilpiperazínicos, previamente selecionados por serem antagonistas de α_{1D} -adrenoceptores e terem alta afinidade por α_{1A} -adrenoceptores e receptores 5-HT_{1A} em roedores, na busca de novos candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da hiperplasia prostática benigna.

2.2 Objetivos Específicos

Em roedores

- ✓ Avaliar o potencial *drug-likeness* dos LDT65 – LDT68 a partir de propriedades físico-químicas e farmacológicas;
- ✓ Determinar a afinidade dos LDT65 – LDT68 pelos α_2 -adrenoceptores, *D₂-like* e muscarínicos;
- ✓ Avaliar a atividade intrínseca dos LDT65 – LDT68 nos receptores 5-HT_{1A};
- ✓ Avaliar a atividade intrínseca e afinidade de um dos LDTs selecionado nos α_{1A} e α_{1D} -adrenoceptores;
- ✓ Avaliar possíveis efeitos tóxicos após administração de dose única dos LDTs *in vivo*;
- ✓ Verificar o efeito do LDT66 sobre a pressão arterial média em animal anestesiado;
- ✓ Verificar o efeito do LDT66 em modelo de pressão intrauretral elevada *in vivo*;

Em material humano:

- ✓ Avaliar o efeito do LDT66 a proliferação celular utilizando células de hiperplasia prostática benigna;
- ✓ Avaliar o efeito do LDT66 sobre a proliferação celular utilizando linhagem de célula prostática tumoral DU-145.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção dos derivados *N*-fenilpiperazínicos

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos (LDT65 – LDT68) foram sintetizados pelo Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro (Laboratório LADETER, Universidade Católica de Brasília). Foram caracterizados através de espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) em um espectrômetro Perkin Elmer (Spectrum BX), espectros de ¹H-RMN (300 e 500 MHz CDCl₃) e de ¹³C-RMN (75 e 125 MHz, CDCl₃) em Varian Plus (7,05 T) e espectrômetros Bruker Avance DRX500 e DRX300, e espectros de massa registrados em espectrômetro Shimadzu LCMS IT-TOF. A análise da placa de cromatografia em camada delgada mostrou um único *spot*, indicando a presença de apenas uma substância, como corroborado pela análise espectrométrica (Chagas-Silva et al., 2014; anexo 1). Os LDT65-LDT68 foram disponibilizados sob a forma de cloridrato com posterior solubilização à concentração de 10 mM em água ultrapura e estoque a -20 °C na forma de pequenas alíquotas. No dia do experimento, diluiu-se uma pequena alíquota da solução estoque necessária à realização do experimento.

3.2 Avaliação teórica das propriedades moleculares dos LDT65 – LDT68

3.2.1 Regra dos 5 (RO5)

As propriedades moleculares dos derivados LDT65 – LDT68 foram calculadas as pelo programa Advanced Chemistry Development, inc. software acd/Percepta versão 14.0.0 (Build 2254), módulo Physchem. E a seguir foram analisadas segundo os parâmetros de Lipinski (“regra dos cinco”, Lipinski et al., 1997), os quais são definidos por quatro regras (apenas 1 pode ser quebrada) de acordo com propriedades moleculares para farmacocinética de um fármaco no corpo humano, o qual deve apresentar: i) até 5 doadores de ligação hidrogênio; ii) até 10 aceptores de ligação hidrogênio; iii) massa molecular menor que 500 Da e iv) LogP menor que 5.

3.2.2 Eficiência do Ligante

A Eficiência do Ligante (EL) é a medida da energia de ligação por átomo de um ligante ao seu receptor. Pode ser calculada através da medida da atividade biológica *in vitro* (ensaios de *binding*) corrigida pela propriedade físico-química da molécula. A eficiência dos derivados em se ligar aos receptores 5-HT_{1A} e α_{1A} -AR foi calculada a partir dos valores de (pKi) dividido por número de átomos não-hidrogênio (isto é, carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e halogênio), normalizando a atividade relativa com o tamanho da molécula (Hopkins et al., 2014):

$$EL = \frac{1,4 \times pKi}{N^{\circ} \text{ de átomos não H}}$$

3.3 Obtenção dos órgãos de animais

Todos os protocolos com animais foram aprovados pelos comitês de ética da UFRJ (CEUA; protocolo: DFBC – ICB011). Ratos Wistar machos, com idade de 3 meses, foram eutanasiados por decapitação. Em seguida, o cérebro de cada animal foi rapidamente retirado e imerso em solução de Krebs (NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM e glicose 11 mM) pH 7,2 a 25 °C. Os cérebros foram colocados sobre uma placa de gelo, onde hipocampus e córtex foram rapidamente dissecados. Após dissecação, os órgãos foram armazenados em nitrogênio líquido (N₂) até a preparação do homogeneizado. Para os ensaios funcionais, as aortas torácicas e próstatas ventrais de rato foram removidas e manipuladas em solução fisiológica (Silva et al., 2002).

Todas as composições das soluções foram descritas ao final do capítulo.

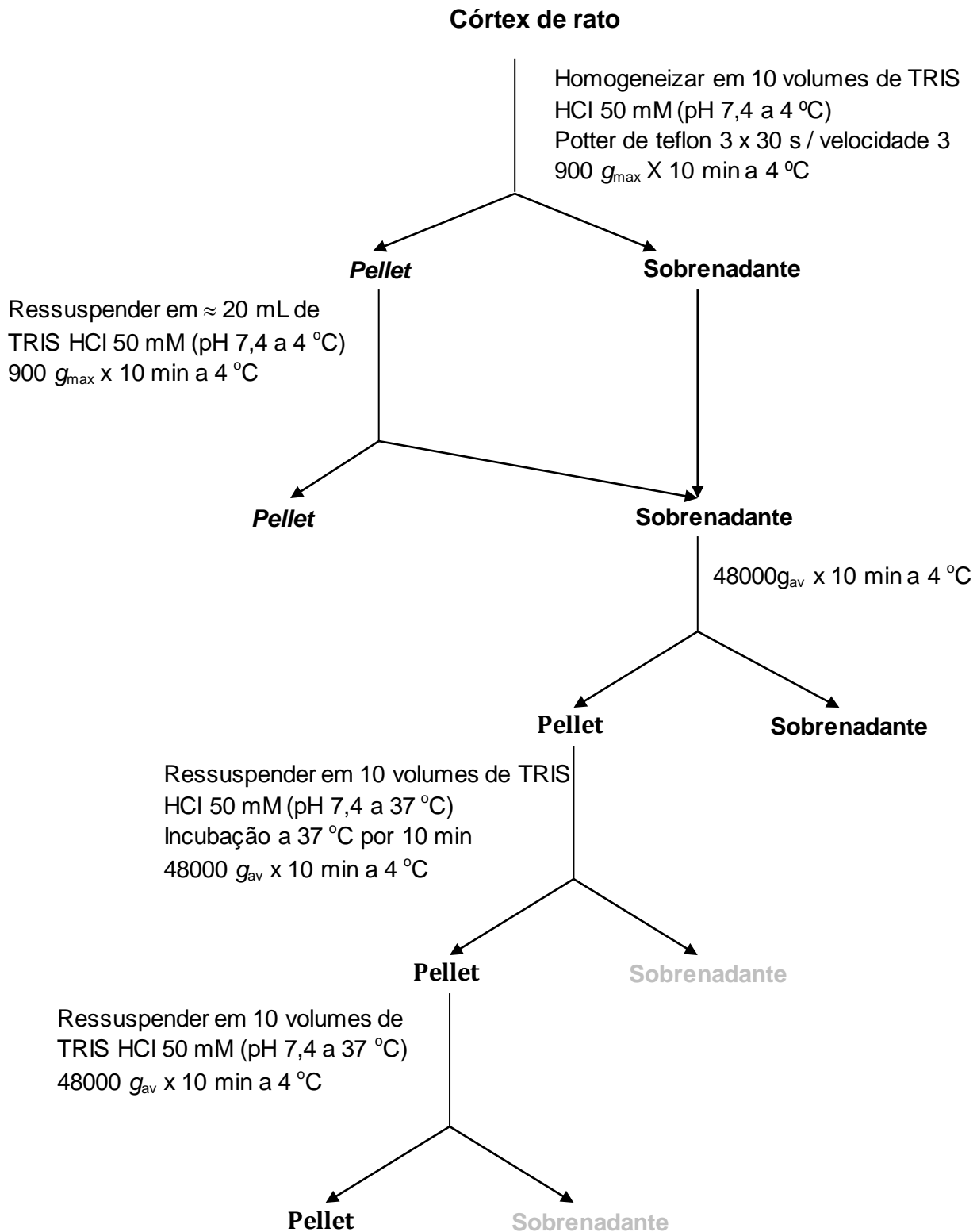
3.4 Preparações Membranares

3.4.1 α_2 -adrenoceptores e receptores muscarínicos nativos

Preparações membranares de córtex neuronal de rato (α_{2A} -AR e receptores muscarínicos) foram obtidas (Neves et al., 2010) seguindo o protocolo a seguir (Figura 8). Os órgãos foram homogeneizados três vezes durante 30 segundos (velocidade 5000 RPM) em um *Potter* com o auxílio de um aparelho motorizado (Fisatom) e pistão de *teflon*, seguido por duas centrifugações sucessivas a $900 \times g_{max}$ (10 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi centrifugado a $48000 \times g_{av}$ (10 minutos, 4 °C) e o *pellet* obtido foi ressuspenso e incubado em solução TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4) a 37 °C por 10 minutos (visando a remoção dos neurotransmissores endógenos). A seguir, a suspensão foi centrifugada duas vezes a $48000 \times g_{av}$ (10 minutos, 4 °C) e então o *pellet* final foi ressuspenso em solução de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

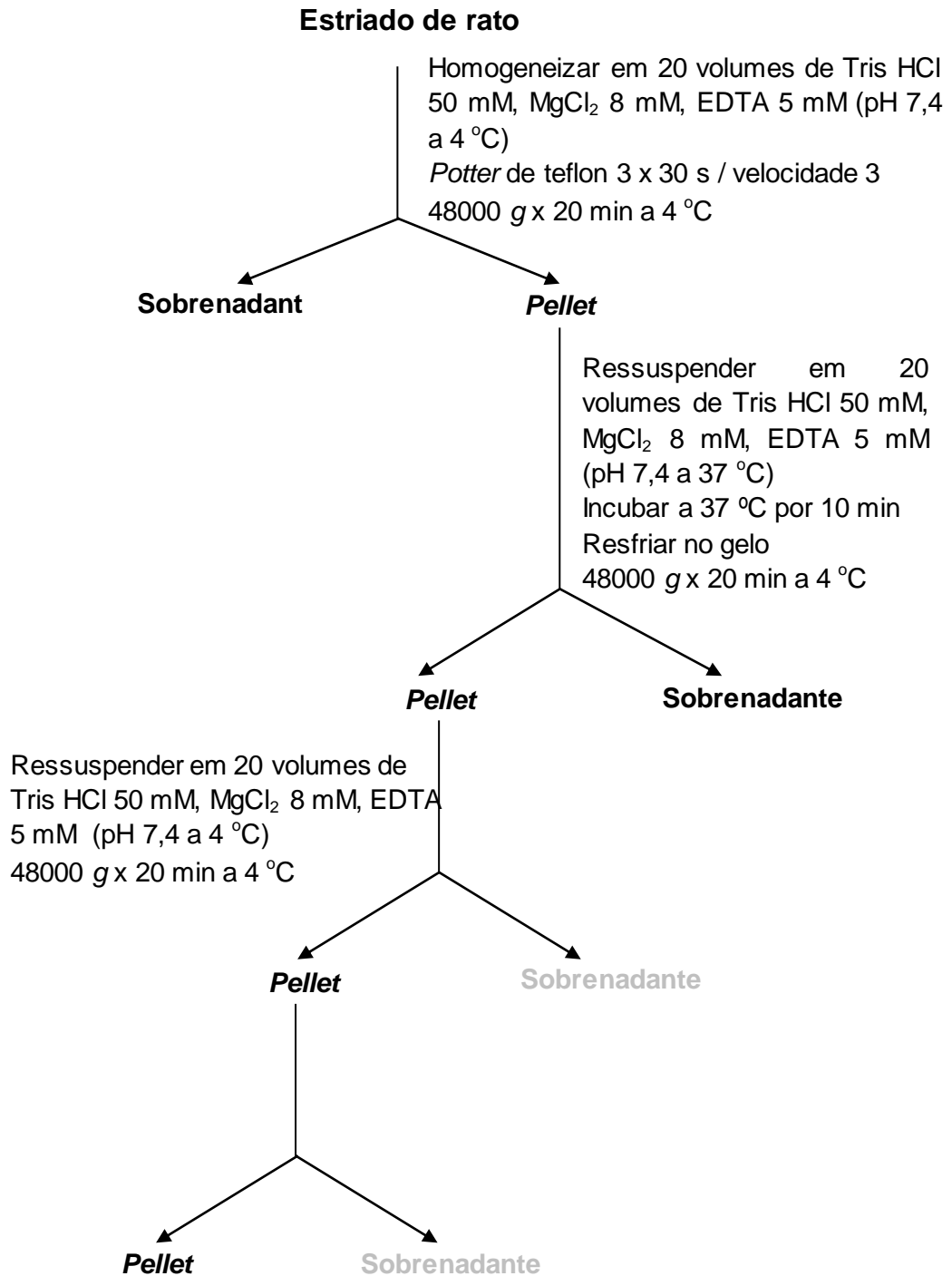
3.4.2 Receptores D_2 -Like nativos

Para obtenção da preparação membranar de estriado de rato (receptores D_2 -“like” – subtipos de receptores dopaminérgicos: D_2 , D_3 e D_4) (Niznik et al., 1985; Terai et al., 1989; Hamdi et al., 1992; Assié et al., 1993), os órgãos foram homogeneizados por três vezes durante 30 segundos em tampão Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 8 mM, EDTA 5 mM (pH 7,4 a 4 °C) (figura 9); a seguir o homogeneizado foi centrifugado a $48000 \times g_{av}$ (20 minutos a 4 °C). O *pellet* foi ressuspenso em Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 8 mM, EDTA 5 mM (pH 7,4 a 37 °C), posteriormente incubado a 37 °C por 10 minutos e resfriado no gelo, e então centrifugado duas vezes a $48000 \times g_{av}$ por 20 minutos a 4 °C. O *pellet* final foi ressuspenso no mesmo tampão na concentração de 1,5 mL/g tecido.



Ressuspender e armazenar em Tris HCl 50 mM (pH 7,4 a 4 °C) na concentração de 1,5 mL/g tecido e armazenar em N₂ líquido até o início do experimento.

Figura 8: Esquema da preparação membranar de córtex de rato (α_2 -adrenoceptores e receptores muscarínicos).



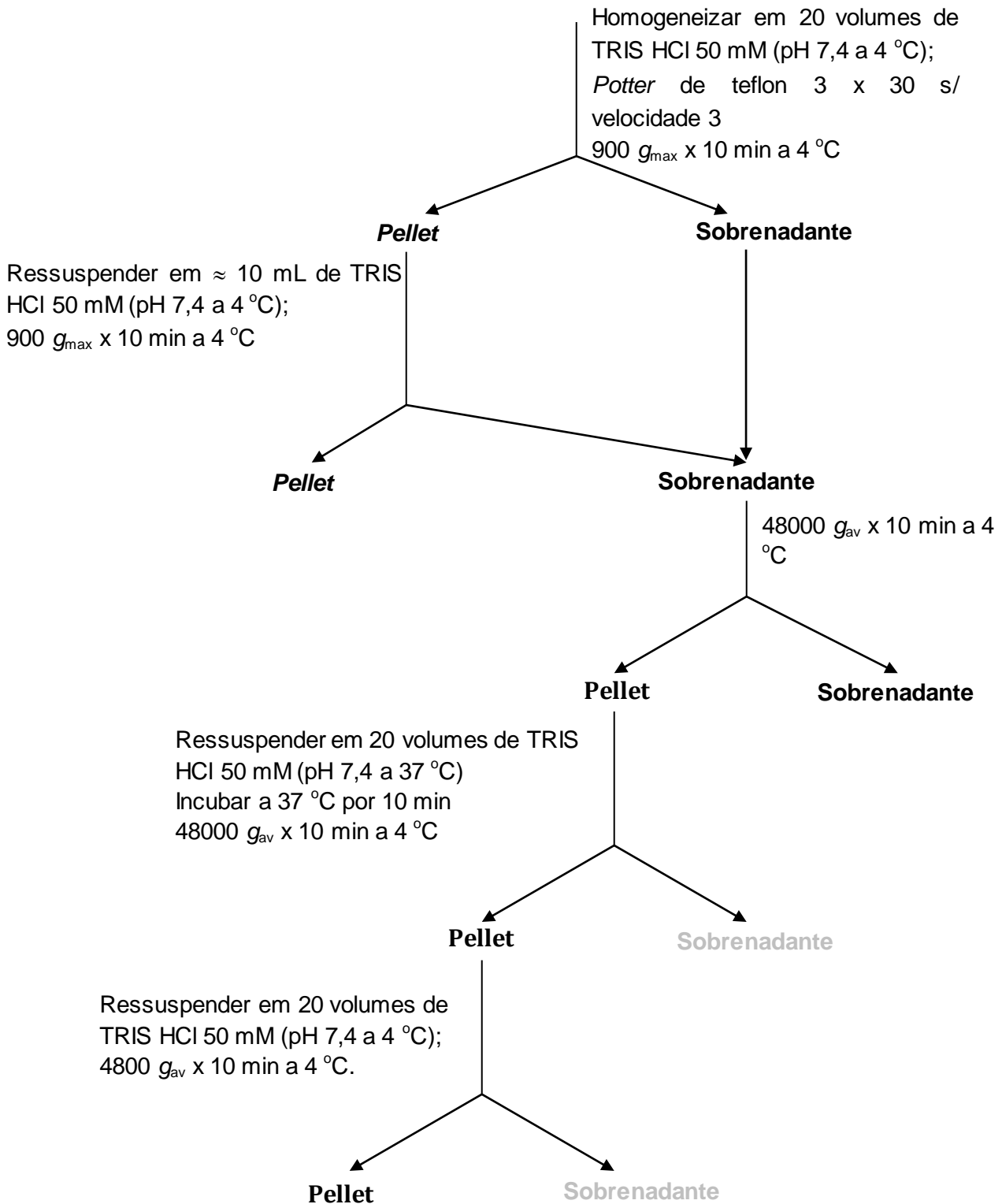
Ressuspender em Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 8mM, EDTA 5mM (pH 7,4 a 4 °C) na concentração de 1,5 mL/g tecido e armazenar em N₂ líquido até o início do experimento

Figura 9: Esquema da preparação membranas de córtex neuronal de rato (receptores D₂-like).

3.4.2 Receptores 5-HT_{1A} nativos

Como fonte de receptores 5-HT_{1A}, utilizamos preparações membranares de hipocampo de rato (Neves et al., 2010), obtidas como detalhado na figura 10. Os órgãos foram homogeneizados em um *Potter* com o auxílio de um aparelho motorizado (Fisatom) e pistão de *teflon*, por três vezes durante 30 segundos, seguido por centrifugação a $900 \times g_{max}$ (10 minutos, 4 °C). O *pellet* foi ressuspenso em solução TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado e submetido ao mesmo procedimento novamente. A seguir o sobrenadante foi centrifugado a $48000 \times g_{av}$ (10 minutos, 4 °C), gerando um *pellet* que foi ressuspenso e incubado na mesma solução a 37 °C por 10 minutos, a fim de se remover os neurotransmissores endógenos. Foi realizada a centrifugação por mais duas vezes a $48000 \times g_{av}$ (10 minutos, 4 °C) e então o *pellet* final foi ressuspenso em solução de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

Hipocampo de rato



Ressuspender em Tris HCl 50 mM (pH 7,4 a 4 °C) na concentração de 1,5 mL/g tecido
Armazenar em N_2 líquido até o início do experimento

Figura 10: Esquema da preparação membranas de hipocampo de rato (receptor 5-HT_{1A})

3.5 Dosagem de proteínas

Todas as dosagens de proteína foram realizadas pelo método colorimétrico proposto por Lowry et al., (1951) modificado para microplaca (placa de 96 poços).

A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada nas concentrações de 50, 100, 200, 250, 350 µg/mL para construir a curva padrão. Foram adicionados 50 µL de água (branco), padrões de proteína ou amostras diluídas de proteína em estudo em diferentes poços. Em placa de 96 poços, adicionou-se a todos os poços 250 µL de uma solução contendo carbonato dissódico 2% em NaOH 0,1N, sulfato cúprico 1% e tartarato de sódio-potássio 2%, seguido da adição de 30 µL do reagente de Folin a cada poço, e homogeneização com pipeta multicanal. A seguir, a placa foi incubada por 45 minutos a temperatura ambiente desde a homogeneização do primeiro poço. Os valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro de placa em comprimento de onda igual a 700 nm. Os cálculos foram realizados utilizando os valores de absorbância da curva padrão *versus* concentração de proteína, os quais foram analisados com o auxílio do programa de regressão não-linear (GraphPad Prism 4.0). Os valores foram expressos em mg proteína/mL de homogeneizado.

3.6 Ensaios de *binding*

3.6.1 α_2 -adrenoceptores (α_2 -AR)

150 µg de membranas de córtex (α_2 -adrenoceptores) foram incubados com 1 nM do radioligante antagonista [3 H]-RX821002 (Uhlén et al., 1991), na presença ou ausência de LDT65–LDT68 (0,1 - 300 µM). A incubação foi realizada por 60 minutos a 30 °C sob lâmpada de vapor de sódio, em meio contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) em um volume final de 500 µL (ligação total). Nos ensaios de saturação foi medida a ligação da [3 H]-RX821002 aos α_2 -AR na ausência e presença concentrações crescentes (0,03 – 10 nM) de RX821002 não radioativo. Este protocolo, classicamente conhecido como experimento de competição, permite uma grande economia de radioligante e preparação. Nestas condições obteve-se a ligação total. A ligação não-

específica foi determinada na presença de 100 μM de bitartarato de adrenalina.

A reação foi parada pela adição (2X) de 4 mL de solução gelada contendo TRIS-HCl 5 mM (pH 7,4 a 4 °C), seguida por filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak) umidificados em 0,5% polietileneimina. Os filtros foram lavados duas vezes com 4 mL da mesma solução sob vácuo para remover todo radioligante livre. Em seguida foram secos e colocados em recipientes contendo líquido de cintilação. A radioatividade retida nos filtros foi determinada em contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR). A ligação específica do [^3H]-RX821002 aos α_2 -AR foi definida como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica. Estas etapas são comuns a todos os ensaios de competição a seguir.

A representação gráfica dos ensaios de saturação (figura 11) foi feita colocando-se na ordenada a ligação específica (*bound*) de RX821002. Para tanto multiplicou-se os valores obtidos de ligação específica de [^3H]-RX821002 em CPM pelo fator de diluição (FD) do [^3H]-RX821002 calculado como: [concentração ligante frio (*i.e.*, não radioativo) + concentração do radioligante] / concentração do radioligante. Na abscissa foram indicadas as concentrações crescentes de RX821002 (frio + radioativo). Os parâmetros constante de dissociação no equilíbrio (K_d), a qual representa a concentração de ligante necessária para ocupar 50% dos sítios receptores, e densidade máxima dos sítios de ligação (B_{max}) foram calculados por regressão não linear a partir dos dados não transformados como descrito na seção 3.12. Os valores de K_d e B_{max} com erros inerentes ao ajuste da curva foram $2,05 \pm 0,28$ nM e 124 ± 7 fmol/mg proteína, respectivamente ($n = 1$).

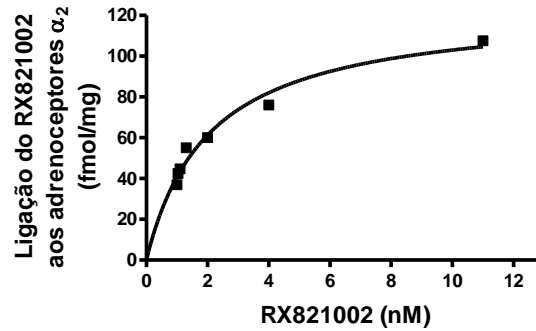


Figura 11: Curva de saturação do RX821002 em membranas de córtex de rato (α_{2A} -adrenocetores). A curva foi obtida utilizando-se os parâmetros calculados por regressão não-linear com o modelo de um sítio de ligação.

Por outro lado, nos ensaios de competição, foram realizadas curvas de inibição da ligação específica do radioligante pelos LDTs para se calcular os valores de concentração inibitória média (CI_{50}) (figura 12).

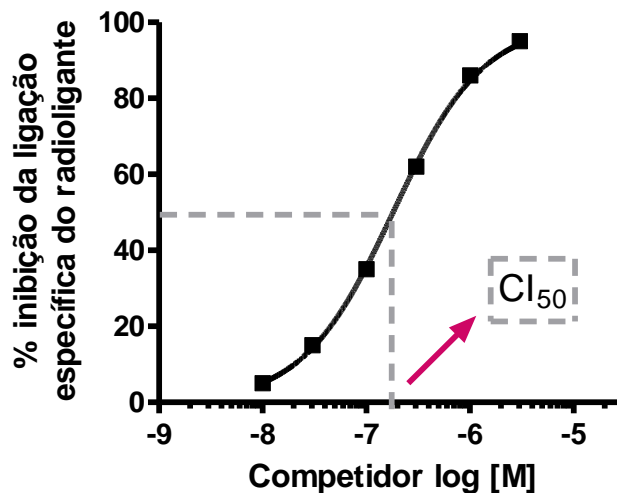


Figura 12: Curva hipotética de competição. Adotamos a representação de “curva log concentração-efeito”, sendo que o efeito, neste caso, corresponde à inibição da ligação do radioligante.

Os valores de CI_{50} foram convertidos aos valores de constante de dissociação do competidor no equilíbrio ou constante de inibição (K_i) através da equação de Cheng-Prusoff (1973):

$$K_i = \frac{CI_{50}}{1 + ([L] / K_d)} \quad (1)$$

Onde K_i = constante de inibição; CI_{50} = concentração inibitória média; $[L]$ = concentração molar do radioligante; K_d = constante de equilíbrio de dissociação do radioligante (medido em ensaio de saturação).

3.6.2 Receptores muscarínicos

Para o *binding* aos receptores muscarínicos (não-seletivo) (Richards, 1990; Castoldi et al., 2006), foram incubados 150 µg de proteínas da preparação de córtex de rato, sob lâmpada de vapor de sódio, e 0,1 nM do radioligante [³H]-QNB, em meio contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 a 4 °C), na ausência e presença dos derivados LDT65–LDT68 (0,1 - 300 µM). A incubação foi realizada por 60 minutos a 25 °C, em um volume final de 500 µL. A ligação não-específica foi determinada na presença de 10 µM de sulfato de atropina. O *binding* específico do [³H]-QNB aos receptores muscarínicos foi definido como a diferença entre *binding* total e *binding* não-específico. Os parâmetros CI_{50} e K_i foram determinados como descrito em 3.6.1. Assumiu-se que o valor de K_d para [³H]-QNB foi 0,05 nM (Luthin e Wolfe, 1984).

3.6.3 Receptores D₂-like

Nos ensaios de *binding* aos receptores D₂-like (Niznik et al., 1985; Terai et al., 1989; Hamdi et al., 1992; Assié et al., 1993; Neves et al., 2010) 50 µg de membrana de estriado de rato foram incubados por 60 minutos a 37°C sob lâmpada de vapor de sódio em meio contendo 0,1 nM do radioligante antagonista [³H]-YM-09151-2, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA e Tris-HCl 50 mM (pH 7,2 a 25°C), na ausência e presença dos derivados LDT65–LDT68 (0,1 - 300 µM), em volume final de 500 µL (ligação total). A ligação não-específica foi medida na presença de 30 µM de sulpirida. O *binding* específico do [³H]-YM-09151-2 aos receptores D₂-like foi definido como a diferença entre

binding total e *binding* não-específico. Os parâmetros CI_{50} e K_i foram determinados como descrito em 3.6.1.

3.6.4 Receptores 5-HT_{1A}

Cerca de 75 µg de membrana de hipocampo foram incubados com 0,5 nM do radioligante antagonista [³H]-*p*-MPPF (Kung et al., 1996; Assié et al., 1999; Noël et al., 2014), na ausência e presença dos derivados LDT65–LDT68 (0,1 - 300 µM) por 45 minutos a 37 °C sob lâmpada de vapor de sódio. O meio reacional (volume final 500 µL) era composto por TRIS–HCl 50 mM (pH 7,4 a 37 °C) e GTP 1 mM para garantir que todos os receptores se encontrassem no estado inativado/desacoplado (Lahti et al., 1992; Noël et al., 2014). A ligação não-específica foi determinada na presença de 10 µM de serotonina. O valor do K_d estimado para [³H]-*p*-MPPF (receptores 5-HT_{1A}) foi de 0,86 nM. A reação foi parada pela adição (3x) de 4 mL de solução gelada contendo TRIS–HCl 5 mM (pH 7,4 a 4 °C), seguida por filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak) umidificados no tampão de *binding*.

3.7 Atividade intrínseca nos receptores 5-HT_{1A}

3.7.1 Razão de valores de K_i

A Atividade intrínseca dos derivados LDT66-LDT68 nos receptores 5-HT_{1A} foi estimada através do cálculo da razão dos valores de K_i obtidos em experimentos de competição com radioligante antagonista (mesma afinidade para os estados de alta e baixa afinidade do receptor, K_i baixa), [³H]-*p*-MPPF, *versus* radioligante agonista (afinidade muito maior pelo estado de alta afinidade, K_i alta), [³H]-8-OH-DPAT (Assié et al., 1999). Deste modo, valores de razão de K_i (K_i baixa/ K_i alta) próximos a 1,0 indicam uma substância competidora antagonista, enquanto valores consideravelmente maiores ou menores do que 1,0, uma substância com perfil de agonista, direto ou inverso, respectivamente. Este método foi previamente validado no nosso laboratório (Noël et al., 2014).

AS afinidades dos derivados LDT65–LDT68 foram determinadas, anteriormente, através do ensaio de *binding* utilizando o radioligante agonista [³H]-8-OH-DPAT.

3.7.2 Ensaio de *binding* do [³⁵S]-GTP γ S

20 μ g de membrana de hipocampo foram incubados em meio contendo 0,2 nM [³⁵S]-GTP γ S, 100 mN NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 0,2 mM DTT, e 20 μ M GDP tamponado com Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) por 60 minutos a 30 °C (Odagaki e Toyoshima, 2007; Noël et al., 2014), na presença ou ausência de 30 μ M de 5-HT e 10 μ M LDT66. A ligação não-específica foi determinada na presença de 100 μ M de GTP γ S.

3.8 Ensaio Funcionais

3.8.1 Aorta de rato

A aorta torácica (α_{1D} -AR) foi removida, livre dos tecidos conectivo e adiposo adjacentes, e, em seguida, cortada em anéis. Os anéis desnudos (3 mm) foram colocados num banho de órgãos contendo 9 ml de solução fisiológica (em mM: 122 NaCl, 5 KCl, 15 NaHCO₃, 11,5 de glucose, 1,25 MgCl₂, 1,25 de CaCl₂, 1,25 de KH₂PO₄) e borbulhado com uma mistura de 95% O₂ / 5% CO₂ (37 °C). Segmentos de aorta foram submetidos a uma tensão de repouso inicial (20 mN). Após recuperação de 1 hora, foi induzida uma contração com fenilefrina (FE) 1 μ M (agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos) e no platô adicionou-se acetilcolina 1 μ M para avaliação da integridade endotelial (Silva et al., 2002). Em seguida a preparação foi lavada e deixada em recuperação por 1 hora. Curvas cumulativas à FE (10⁻⁹–10⁻⁵ M) foram realizadas na presença de propranolol 1 μ M (para impedir a ligação da FE aos receptores β -adrenérgicos), antes e após a incubação do LDT66 (10, 30 ou 100 nM), adicionados 1 hora antes

A variação da força gerada, medida em mN, foi quantificada através do transdutor de força. Os dados foram digitalizados no sistema MacLab 8S conectado a este transdutor, e então analisados através do programa Chart 3.4/s *software* (MacLab, Inc., USA).

As curvas concentração-resposta à FE foram usadas para calcular as concentrações que promoveram metade do efeito máximo (CE₅₀) na ausência e presença do LDT, bem como o efeito máximo (E_{max}) da fenilefrina. Os resultados foram expressos em percentual da resposta máxima à FE, a qual foi considerada 100%. A razão entre o valor de CE₅₀ na presença e na ausência

do antagonista calculada individualmente para cada experimento corresponde ao parâmetro denominado “razão de concentrações” (ou CR). A afinidade aparente do antagonista LDT (K_B) foi determinada através da equação de *Schild* (Kenakin, 1993):

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

onde B = concentração molar do antagonista e K_B = constante de equilíbrio de dissociação do antagonista

3.8.2 Próstata de rato

Segmentos de 10 mm da próstata ventral de rato (α_{1A} -AR) (Nanda et al., 2009) foram fixados a um transdutor de força isométrica (GRASS FT-03) e o conjunto foi mergulhado em cubas contendo 9 mL de solução fisiológica (NaCl 138 mM, KCl 5,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, NaHCO₃ 15 mM e glicose 5,5 mM) (Picarelli et al., 1962), mantidos a 37 °C com aeração constante de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sob a tensão inicial (pré-carga) de 10 mN por 60 minutos. Em seguida, foram induzidas duas contrações com solução de KCl 60 mM para obtenção de contrações reprodutíveis. Após 45 minutos, três curvas cumulativas à fenilefrina (FE) (10^{-8} – 10^{-4} M) foram realizadas na presença de propranolol 0,1 μ M (para bloquear os β -adrenoceptores), com intervalo de 1 hora entre si. A terceira curva cumulativa foi realizada na presença do derivado LDT66 (10, 30 ou 100 nM), adicionado 1 hora antes.

3.9 Cultura de células humanas

As células estromais de HPB foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Eurico Nasciutti, ICB, UFRJ e as células tumorais de próstata humana, DU-145, foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ). As células DU-145 (74^a e 75^a passagens) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de piruvato e 1% de penicilina (10000 U/mL)/estreptomicina (10000 μ g/mL) (Invitrogen, EUA) e mantidas em incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C. Quando confluentes, as células foram subcultivadas utilizando solução tripsina 0,25% (Invitrogen, EUA)

em solução salina tamponada (PBS, em mM: NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 2 mM e KCl 5 mM) por 10 minutos para dissociação, e em seguida a tripsina foi inativada pela adição de meio RPMI com 10% SFB.

3.10 Ensaio de proliferação *in vitro*

Para os ensaios de proliferação e viabilidade celular, as células DU-145 e estromais de HPB foram cultivadas em meio RPMI isento de soro fetal bovino por 24 horas (Souza et al., 2011). A seguir o meio foi substituído por meio RPMI 1640 suplementado com 2,5% SFB e as células foram tratadas com 5-HT (1 ou 3 μM, respectivamente para os dois tipos celulares) ou fenilefrina (3 μM) na ausência ou presença do LDT66 (50 nM), BMY7378 (antagonista α_{1D}-AR), *p*-MPPF (antagonista dos receptores 5-HT_{1A}), adicionados 30 minutos antes da adição dos agonistas, ou veículo. Após 24 horas o meio foi descartado e os tratamentos foram repetidos, para prevenir uma possível degradação das substâncias até completar 48 horas.

As substâncias utilizadas no tratamento das células foram diluídas diariamente em meio RPMI sem SFB e protegidas da luz.

3.10.1 Avaliação da viabilidade celular

Após 48 horas de tratamento, o meio contendo as substâncias foi retirado e a viabilidade celular foi determinada através de um ensaio colorimétrico utilizando a técnica do sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], MTT (Mosmann, 1983). O ensaio baseia-se no metabolismo do MTT células viáveis gerando um cristal roxo denominado formazan. O aumento da absorbância é um indicativo de aumento do número de células viáveis, sendo uma medida indireta de proliferação celular.

Inicialmente, o meio de cada poço (5000 células/poço; placa de 96 poços) foi trocado por 100 μL de meio RPMI fresco, e adicionado 10 μL de MTT 12 mM. A placa foi incubada a 37 °C por 4 horas protegida da luz. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μL da solução 0,1g/mL SDS-HCl e incubados a 37 °C por mais 4 horas. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placa em comprimento de onda igual a 570 nm. A

absorbância medida foi diretamente correlacionada ao número de células ativas metabolicamente. Os valores foram expressos como percentual em relação ao grupo controle (basal), o qual foi considerado como 100%.

3.10.2 Contagem celular

A contagem do número de células viáveis foi determinada utilizando as células controle (basal) e tratadas em placa de 24 poços (25000 células/poço). As células foram retiradas pela adição de tripsina 0,25% em solução PBS por 10 minutos. A suspensão contendo células foi centrifugada a 173 g por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em PBS e foi adicionado o azul de Trypan (0,4% em PBS). A câmara de Neubauer foi cuidadosamente preenchida com 10 µL desta suspensão e a seguir levada ao microscópio para contagem do número de células não coradas pelo azul de Trypan, ou seja, que estavam com sua membrana plasmática intacta, a fim de se determinar a porcentagem de células viáveis.

3.11. Ensaios *in vivo*

3.11.1 Pressão arterial (PAM):

Ratos Wistar machos (250-350 g) foram anestesiados com pentobarbital sódico i.p. (60 mg/kg). Após indução da anestesia, foram traqueostomizados, a veia jugular direita e a artéria carótida foram canuladas utilizando-se cânulas de polietileno preenchidas com solução salina heparinizada (50 U/mL) para administração das substâncias teste ou para a conexão com o transdutor de pressão (ADInstruments, Austrália), respectivamente. A pressão arterial média (mm Hg) foi monitorada continuamente (PowerLab, ADInstruments Pty Ltd, Austrália). Após 30 minutos de estabilização do animal, prazosina, tamsulosina, LDT66 (100 µg/kg peso corporal, i.v., diluídos em salina isotônica) ou veículo (100 µl) foram injetados em bolus, e a pressão arterial foi monitorada a cada 10 minutos. Os dados foram expressos como percentual de redução da pressão arterial inicial.

3.11.2 Pressão intra-uretral

Ratos Wistar machos (250-350 g) foram anestesiados, traqueostomizados e a veia jugular direita foi canulada, como descrito acima para administração das substâncias teste. A bexiga, a próstata e a uretra foram expostas através de uma incisão na linha média da parede abdominal. Foi inserido um cateter, preenchido com solução salina heparinizada (50 U/mL), através do ápice da bexiga até a uretra prostática e logo após foi fixado com linha de algodão à saída da bexiga e ao término da próstata. O outro lado do cateter foi conectado ao transdutor de pressão (ADInstruments, Austrália) preenchido com água para medir a pressão intra-uretral em função do deslocamento da coluna de água. Após 30 minutos de estabilização, realizou-se uma curva dose-resposta à FE (1–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. em bolus), e aguardaram-se mais 30 minutos para administração do LDT66 ou tamsulosina (0,1 e 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. em bolus, respectivamente), seguida da administração de FE 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.v. em bolus). As administrações foram feitas com um intervalo de 10 minutos entre as doses (Figura 13). Os dados foram expressos como percentual do aumento da pressão intra-uretral inicial.

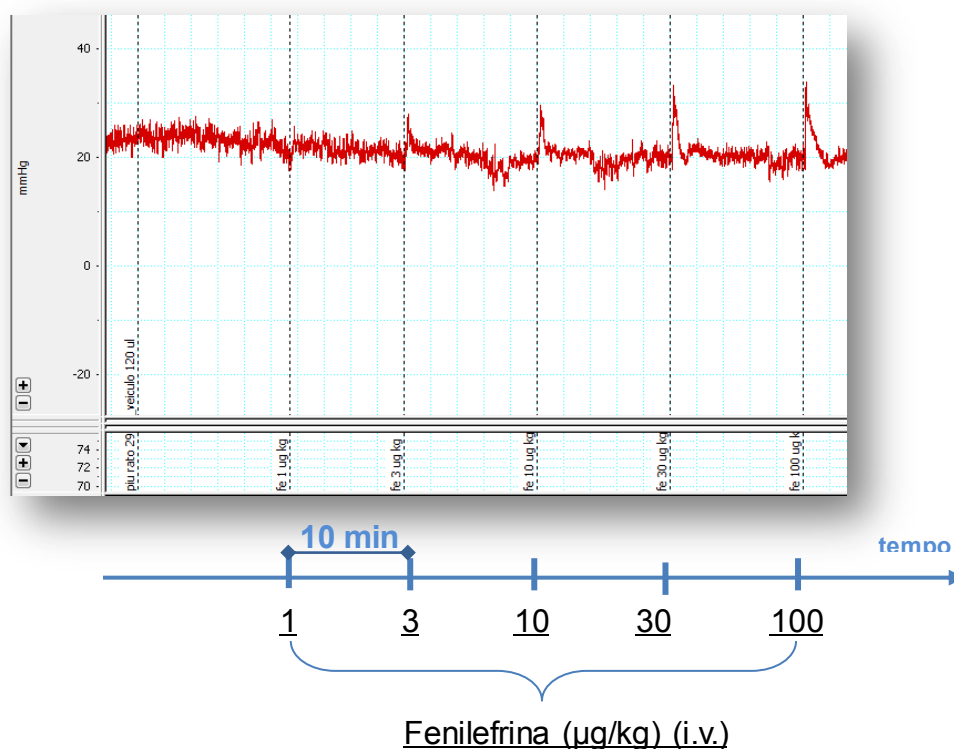


Figura 13: Registro típico de pressão intra-uretral de rato.

3.12 Avaliação do efeito dos LDTs sobre a temperatura corporal e comportamento

Camundongos *Swiss* (fêmeas, 25-30 g, 6 animais por condição) foram tratados com LDTs nas doses de 10 (LDT65-LDT68) ou 100 µg/kg (LDT65 e LDT66) por via intraperitoneal. No grupo controle foram administrados 100 µL veículo. A temperatura foi medida através de sonda retal antes e após 30 e 60 minutos do tratamento. A seguir, os grupos foram observados, sob o âmbito comportamental de acordo com método descrito (Lorke, 1983, modificado; Souza et al., 2011), nos seguintes tempos exatos, a contar a partir do momento da administração: 2, 4, 8 horas e uma vez por dia até completar 14 dias. A tabela 1 descreve os parâmetros avaliados

Tabela 1: Parâmetros fisiológicos avaliados *in vivo*

Parâmetros fisiológicos*	Ítems da avaliação
Estado de atenção e bem-estar	Aparência geral, irritabilidade
Coordenação motora	Atividade geral, resposta ao toque, resposta à constrição da cauda, contração abdominal, caminhada, rigidez do reflexo
Tônus muscular	-
Atividade do sistema nervoso central	Tremores. Convulsão, hiperatividade, sedação, hipnose e anestesia
Atividade do sistema nervoso autônomo	Lacrimejamento, micção, defecação, pilo-ereção, hipotermia e respiração
Consumo de água e ração	-

*Lorke, 1983; Souza et al., 2011.

3.12 Análise dos dados e tratamento estatístico

Os dados de força obtidos nos ensaios funcionais foram analisados por regressão não-linear para se calcular os parâmetros de concentração média efetiva (CE_{50}) e de efeito máximo (E_{max}), e também o efeito alcançado pelo agonista na presença do LDT66, utilizando o mesmo *software* GraphPad Prism.

A diferença entre os grupos experimentais foi analisada por análise de variância fator único (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls (mais de 2 grupos), considerando $P < 0,05$. Para verificar se houve diferença significativa entre as medidas efetuadas antes e depois do tratamento com LDT66 foi realizado teste *t* pareado, considerando um risco alfa de 5% (diferenças consideradas significativas se “*P*” for menor do que 0,05).

3.14 Listagem de reagentes

Os radioligantes 4-(2'-metoxi-)-fenil-1-[2'-(*N*-2"-piridil)-*p*-fluorobenzamido]etil-piperazina ($[^3\text{H}]\text{-}p\text{-MPPF}$ – atividade específica 74,2 Ci/mmol), $[^3\text{H}]\text{-}N\text{-}(1\text{-benzil-2-metilpirrolidina-3-il)-5-cloro-2-metoxi-4-(metilamino)benzamida}$ ($[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$ – atividade específica 82,7 Ci/mmol) e $[^{35}\text{S}]\text{-guanossina 5'-O-(3-tiotrifosfato)}$ ($[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ – atividade específica 1250 Ci/mmol) foram adquiridos da Perkin-Elmer (New England Nuclear Life Science Products, Massachusetts/USA), 2-[2-(2-Metoxi-1,4-benzodioxanil)]imidazolina ($[^3\text{H}]\text{-RX821002}$ – atividade específica 60 Ci/mmol) e o $[^3\text{H}]\text{-benzilato de quinuclidina}$ ($[^3\text{H}]\text{-QNB}$ – atividade específica 48 Ci/mmol) da Amersham (UK). (-)-epinefrina e guanossina 5'-trifosfato hidratado (GTP) foram comprados da Sigma, São Paulo, Brasil. Imbina cloridrato, (R)-tamsulosina cloridrato e a (R,S)-(\pm)-sulpirida foram adquiridas da Tocris Bioscience(USA). 5-hidroxitriptamina cloridrato, prazosina cloridrato, acetilcolina cloridrato, (R)-(-)-fenilefrina cloridrato, bitartrato de adrenalina, (\pm)-propranolol cloridrato, BMY7378 cloridrato foram comprados da SIGMA, EUA.

4. Resultados

4.1 Avaliação do potencial *drug-likeness* dos LDT65 – LDT68 a partir de propriedades físico-químicas e farmacológicas

4.1.1 Regra dos 5 de Lipinski

Os derivados LDT65 – LDT68 foram considerados candidatos a protótipos com potencial atividade por via oral ativos, pois passaram pela RO5 (Lipinski et al., 1997) com no máximo uma regra violada (Tabela 2).

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos derivados *N*-fenilpiperazínicos

Propriedades físico-químicas ^a	LDT65	LDT66	LDT67	LDT68	RO5 ^b
Aceptores de ligação Hidrogênio	3	3	3	3	≤ 10
Doadores de ligação Hidrogênio	0	0	0	0	≤ 5
Massa Molecular	262,39	276,42	290,45	304,48	≤ 500
cLogP	3,94	4,47	5,01	5,54	≤ 5
Nº de regras violadas	0	0	1	1	≤ 1

^a Propriedades moleculares calculadas pelo programa Advanced Chemistry Development, inc. software acd/Percepta versão 14.0.0 (Build 2254), módulo PhysChem. ^b

4.1.2 Eficiência do Ligante

Ao combinar as propriedades farmacológicas e físico-químicas dos derivados LDTs, os derivados apresentaram eficiência de ligante acima do valor mínimo aceitável (superior a 0,3; Tabela 3).

Tabela 3: Combinação das Propriedades físico-químicas e farmacológicas dos derivados *N*-fenilpiperazínicos

Eficiência do ligante (EL)	LDT65	LDT66	LDT67	LDT68
α_{1A} -AR ^a	0,52	0,51	0,47	0,47
5-HT _{1A} ^b	0,57	0,58	0,51	0,51

^{a,b} EL calculada a partir dos valores médios de *K_i* obtidos através de ensaios de *binding* utilizando preparações de fígado de coelho e hipocampo de rato, respectivamente (Chagas-Silva, 2010).

4.2 Determinação da afinidade dos LDT65 – LDT68 pelos α_{2A} -adrenoceptores, *D₂-like* e muscarínicos

Foram realizados ensaios de competição para avaliar a afinidade dos derivados LDTs por diferentes receptores *GPCRs* não-alvos para o tratamento da HPB (α_{2} -AR, *D₂-like*, muscarínicos não-seletivos). Os dados obtidos foram usados como um dos critérios considerado no processo de seleção das substâncias a serem investigadas mais em detalhes posteriormente.

4.2.1 Inibição da ligação da [³H]RX821002 aos α_{2A} -adrenoceptores

Os derivados LDT65 – LDT68 inibiram a ligação específica do [³H]RX821002, em geral com afinidade semelhante e relativamente baixa (*K_i* na faixa μ M) (Figura 14). Porém, a análise dos dados revelou que o LDT65 possui a menor afinidade (Tabela 4).

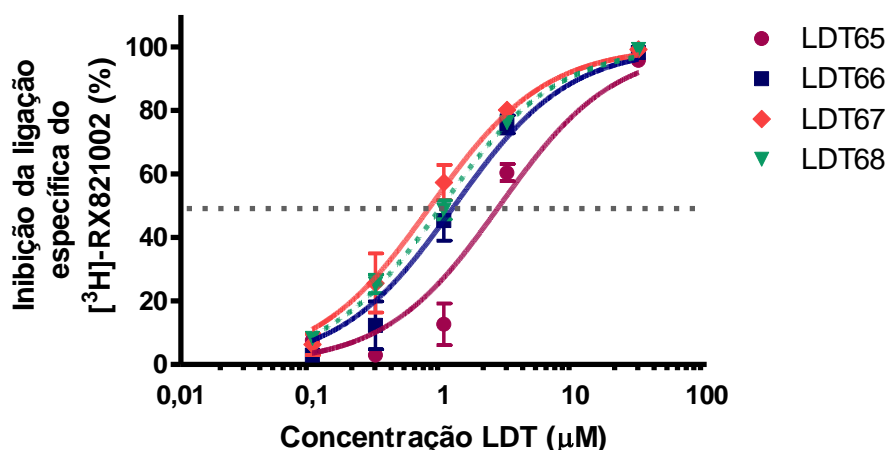


Figura 14: Inibição da ligação específica do $[^3\text{H}]\text{-RX821002}$ aos adrenocetores α_2 expressos em membranas de córtex de rato pelos derivados LDT65 – LDT68. A figura representa a média \pm EPM de 5 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 4: Parâmetros farmacológicos dos LDTs em $\alpha_{2A}\text{-AR}$ nativos de córtex de rato.

LDTs	$\alpha_{2A}\text{-AR}$	
	$\log \text{CI}_{50}^a$ (M) (n)	K_i^b (μM)
LDT65	$-5,60 \pm 0,06$ (5)	1,5
LDT66	$-5,92 \pm 0,06^*$ (5)	0,8
LDT67	$-6,10 \pm 0,06^{***}$ (5)	0,5
LDT68	$-6,01 \pm 0,03^{**}$ (5)	0,6

^{*} $P < 0,05$, ^{**} $P < 0,01$ e ^{***} $P < 0,001$ vs. LDT65, analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls. ^aValores de CI_{50} foram calculados individualmente por regressão não-linear utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média \pm EPM; ^b Valores de K_i foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff. Os experimentos (n = 5) foram realizados em triplicata.

4.2.2 Inibição da ligação da $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$ aos receptores $D_2\text{-like}$

Todos os derivados LDTs apresentaram algum grau de inibição da ligação específica do $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$, com valores de K_i na faixa

submicromolar de concentração (Tabela 5), distinguindo-se dois grupos com afinidades distintas (LDT65 – LDT66 *versus* LDT67 – LDT68) (Figura 15).

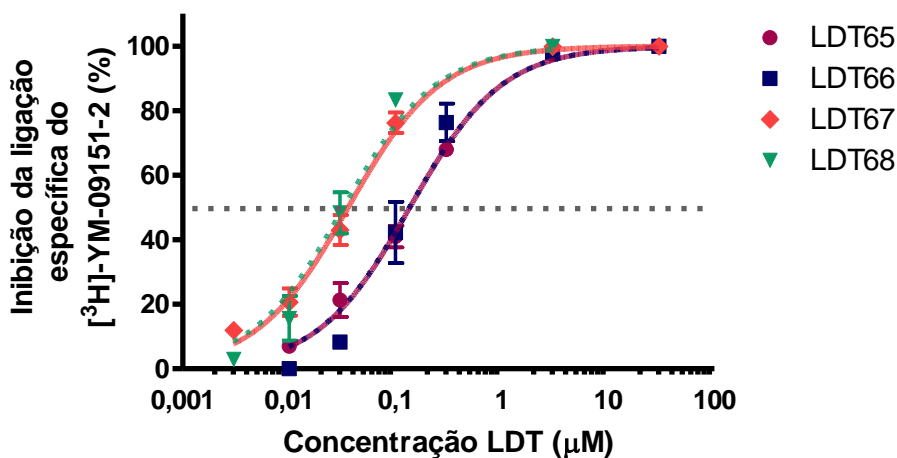


Figura 15: Inibição da ligação específica do $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$ aos receptores $D_2\text{-like}$ expressos em membranas de estriado de rato pelos derivados LDT65 – LDT68. A figura representa a média \pm EPM de 4 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 5: Parâmetros farmacológicos dos LDTs em receptores $D_2\text{-like}$ nativos de córtex de rato.

LDTs	$D_2\text{-like}$	
	$\log \text{CI}_{50}$ (M) (n)	K_i (nM)
LDT65	$-6,88 \pm 0,5$ (4)	125
LDT66	$-6,92 \pm 0,11$ (4)	122
LDT67	$-7,47 \pm 0,07^*$ (4)	33
LDT68	$-7,49 \pm 0,09^*$ (4)	27

* $P < 0,001$ vs. LDT65 e LDT66, analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls. Valores de CI_{50} foram calculados individualmente por regressão não-linear utilizando o *software* GraphPad Prism (USA), e expressos como média \pm EPM; Valores de K_i foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff. Os experimentos (n = 4) foram realizados em triplicata.

4.2.3 Inibição da ligação da [³H]QNB a receptores muscarínicos

A inibição da ligação específica do [³H]QNB por LDTs só foi observada em concentrações relativamente altas (acima de 10 μM – vide Figura 16), tendo portanto afinidade reduzida pelos receptores muscarínicos (Tabela 6).

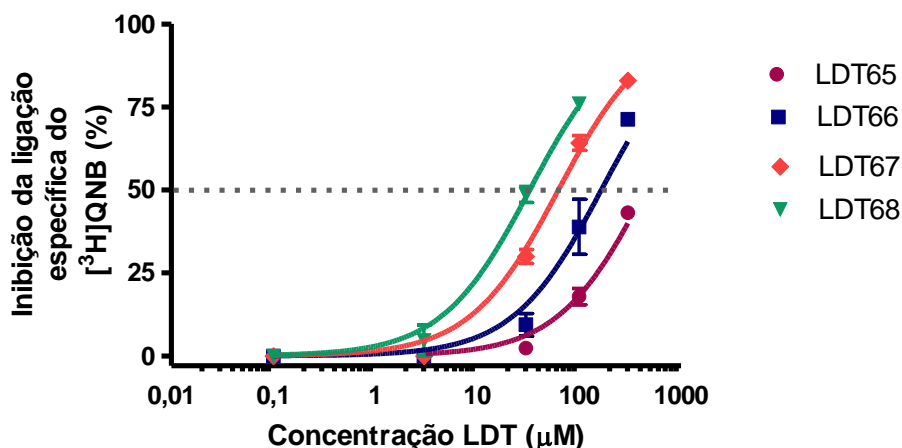


Figura 16: Inibição da ligação específica do [³H]QNB aos receptores muscarínicos expressos em membranas de córtex de rato pelos derivados LDT65 – LDT68. A figura representa a média ± EPM de 3 experimentos individuais realizados em triplicata

Tabela 6: Parâmetros farmacológicos dos LDTs em receptores muscarínicos nativos de córtex de rato.

LDTs	M (não seletivo)	
	log CI ₅₀ (M) (n)	K _i (μM)
LDT65	-3,30 ± 0,08 (3)	172
LDT66	-3,80 ± 0,08* (3)	54
LDT67	-4,20 ± 0,02** (3)	21
LDT68	-4,50 ± 0,04*** (3)	11

P* < 0,001 vs. LDT65. *P* < 0,01 vs. LDT66. ****P* < 0,001 vs. LDT65 e LDT66, analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls). Valores de CI₅₀ foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM de 3

experimentos individuais. Valores de K_i foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff. Os experimentos ($n = 3$) foram realizados em triplicata.

4.3 Avaliação da atividade intrínseca dos LDTs nos receptores 5-HT_{1A}

Anteriormente, caracterizamos a afinidade dos derivados *N*-fenilpiperazínicos LDT65 – LDT68 pelos receptores 5-HT_{1A}. Nos ensaios de *binding* utilizando o radioligante agonista [³H]-8-OH-DPAT esta série apresentou alta afinidade (nM) (Chagas-Silva, 2010), porém ainda não havia sido definida sua atividade intrínseca.

A determinação da atividade intrínseca de um fármaco atuando no receptor metabotrópico 5-HT_{1A} foi determinada através do cálculo da razão dos valores de K_i obtidos em experimentos de competição com radioligante antagonista ([³H]-*p*-MPPF na presença de uma concentração alta de GTP - estado de baixa afinidade para agonista) *versus* radioligante agonista ([³H]-8-OH-DPAT – estado de alta afinidade para agonista) (Assié et al., 1999). A 5-HT apresentou-se como agonista total, uma vez que a razão dos valores de K_i foi de 76,6, sendo muito maior do que 1.0 (Noël et al., 2014).

Com relação aos derivados LDTs, todos apresentaram alta afinidade pelos receptores 5-HT_{1A} marcados pelo radioligante antagonista (Figura 17, Tabela 7), porém LDT65 apresentou a menor afinidade.

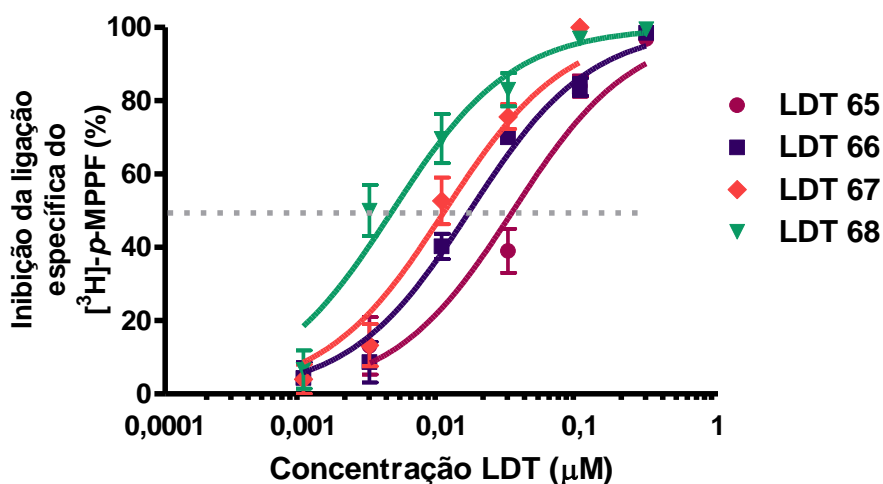


Figura 17. Inibição da ligação específica do [³H]-*p*-MPPF aos receptores 5-HT_{1A} expressos em membranas de hipocampo de rato pelos derivados LDT65

– LDT68. A figura representa a média \pm EPM de 3 - 4 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 7: Parâmetros farmacológicos dos LDTs em receptores 5-HT_{1A} nativos de hipocampo de rato.

LDT's	5-HT _{1A}	
	log CI ₅₀ (M) (n)	K _i (nM)
LDT65	-7,48 \pm 0,04* ^{***} (4)	21
LDT66	-7,79 \pm 0,05* ^{***} (4)	10
LDT67	-7,98 \pm 0,06** (3)	7
LDT68	-8,33 \pm 0,08 (3)	3

*, ^{***} $P < 0,01$ vs. LDT66, $P < 0,001$ vs. LDT67 e LDT68; *, ^{***} $P < 0,05$ vs. LDT67 e $P < 0,001$ vs. LDT68; e ^{**} $P < 0,01$ vs. LDT67 analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls. Valores de log CI₅₀ foram calculados individualmente por regressão não-linear utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média \pm EPM; Valores de K_i foram calculados através da equação de Cheng e Prusoff. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os valores das razões de K_i para os LDT65 - LDT68 foram próximos a 1,0 (Tabela 8), o que sugere que estes derivados *N*-fenilpiperazínicos são antagonistas de receptores 5-HT_{1A} (Assié et al., 1999; Noël et al., 2014).

Tabela 8: Estimativa da atividade intrínseca dos LDT65 – LDT68 em receptores 5-HT_{1A} nativos.

LDTs	K_i alta (nM)	K_i baixa (nM)	K_i baixa/ K_i alta
LDT65	18	21	1,2
LDT66	5	8	1,6
LDT67	18	7	0,4
LDT68	9	3	0,3
5-HT^a	2,46	186	76,6
clozapina^a	259	847	3,29

Valores de K_i foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff, a partir de experimentos de competição com radioligante agonista [³H]-8-OH-DPAT ($K_{i\text{alta}}$) e com o radioligante antagonista [³H]-p-MPPF na presença de 1 mM GTP ($K_{i\text{baixa}}$). Os experimentos foram realizados em triplicata. ^aDados da 5-HT (agonista) e clozapina (agonista parcial) foram retirados de Noël et al., 2014.

No ensaio utilizando o [³⁵S]-GTPγS, houve a estimulação da ligação basal pela adição de 5-HT 30 μM (86,3 ± 6,5% de estimulação – $P < 0,01$), o que é compatível com um agonista. Em contrapartida, a adição do LDT66 10 μM não apresentou efeito significativo (8,4 ± 2,7%, $P > 0,05$; um experimento em quadruplicata), corroborando o perfil antagonista observado pelo método da razão de K_i . Este resultado foi base da escolha do LDT66 dentre os derivados LDTs para dar continuidade ao estudo.

4.4 Determinação da afinidade e atividade intrínseca do derivado LDT66 pelos α_{1D}-AR e α_{1A}-AR

Durante a dissertação de mestrado foi verificado através dos ensaios de contração isométrica em aorta de rato o perfil antagonista dos LDTs sobre α_{1D}-AR. No entanto, para o estudo de antagonistas competitivos, faz-se necessário a execução de curvas cumulativas à fenilefrina, antes e após o tratamento com pelo menos três concentrações distintas dos antagonistas para que seja possível elaborar a regressão de Schild (Arunlakshana e Schild, 1959; Kenankin, 1993). Nesta etapa *in vitro* priorizamos o LDT66, por ter melhor perfil em relação aos demais.

4.4.1 α_{1D} -Adrenoceptores

Primeiramente, o BMY7378 e a tamsulosina, substâncias já conhecidas pelo antagonismo de α_{1D} -AR, foram utilizadas neste modelo como controles positivos. Foram utilizadas uma única concentração de cada substância (10 nM), e a análise das curvas na ausência e presença dos antagonistas forneceu valores de K_B compatíveis aos da literatura (Tabela 9) (Kenny et al., 1995; Goetz et al., 1995).

Na presença de concentrações crescentes do LDT66 (10, 30 e 100 nM), as curvas concentração-resposta à fenilefrina foram deslocadas para direita, de forma paralela, alcançando resposta máxima semelhante à da curva controle (Figura 13). Consequentemente houve um aumento do valor de CE_{50} da fenilefrina (Tabela 9). A análise da regressão de Schild mostrou uma inclinação da reta próximo a 1,0 ($0,80 \pm 0,13$) o que sugere que o LDT66 é um antagonista competitivo superável dos α_{1D} -AR. Além disso, o alto valor de pA_2 (8,66) ($pA_2 = pK_B$, já que regressão foi linear com inclinação da reta próximo a 1) medido na intersecção da reta de regressão com a abcissa (Figura 18) indica que o LDT possui alta afinidade pelo receptor α_{1D} -adrenérgico (Tabela 10).

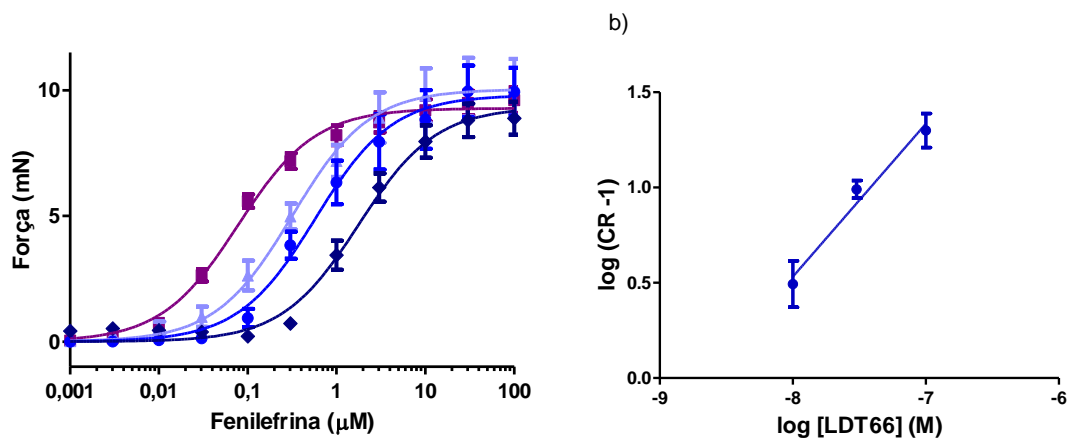


Figura 18: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em aorta de rato, na ausência (■) e presença do LDT66 ((▲) 10, (●) 30 e (◆) 100 nM); b) Regressão de Schild. Dados estão expressos como média ± EPM de 3-7 experimentos individuais.

Tabela 9: Efeito dos antagonistas de adrenoceptores α_1 nas contrações de anéis de aorta de rato induzidas por fenilefrina.

LDT66	log CE ₅₀ (M) ^a			n	
	Concentrações	Controle	Com LDT		CR
10 nM		-7,08 ± 0,08	-6,45 ± 0,16	4,7	6
30 nM		-7,26 ± 0,01	-6,23 ± 0,05	10,9	3
100 nM		-7,09 ± 0,07	-5,76 ± 0,05	23,7	7
BMY7378 10 nM		-6,99 ± 0,07	-6,36 ± 0,04	4,2	5
tamsulosina 10 nM		-6,62 ± 0,10	-4,63 ± 0,12	100,1	3

^a Valores médios ± EPM de log CE₅₀. O CR (razão entre as CE₅₀ na presença e ausência da substância teste) é a média dos CR's calculados a partir dos CE₅₀ individuais calculados por regressão não linear.

Tabela 10: Afinidade de antagonistas por adrenoceptores α_{1D} nativos de aorta de rato

Substância	K_B (nM)	
	$[pK_B \pm EPM]$	Inclinação
LDT66	2,18 ^a	0,80 \pm 0,13
BMY7378	3,03 [8,52 \pm 0,06]	-
tamsulosina	0,10 [9,99 \pm 0,06]	-

^aCalculado a partir do valor de pA_2 obtido pela regressão de Schild. Os valores de K_B do BMY7378 e da tamsulosina foram calculados a partir da equação de Schild, em razão de ter sido testada uma única concentração (10 nM). Os valores de pK_B expressam a média e EPM de 3-7 experimentos realizados em triplicata.

4.4.2. α_{1A} -Adrenoceptores

Ensaio funcionais foram realizados através da contração de segmentos da próstata ventral de rato, tecido que expressa funcionalmente e majoritariamente os α_{1A} -adrenoceptores (Marshall et al., 1995; Nasu et al., 1996; Hiraoka et al., 1999). A curva concentração-resposta à fenilefrina apresentou um valor médio de CE_{50} igual a 0,76 μ M aproximado ao da literatura (0,42 μ M; Thiyagarajan et al., 2002).

Após tratamento com LDT66 nas diferentes concentrações (10, 30 e 100 nM), a curva cumulativa à fenilefrina sofreu um deslocamento para direita em relação a curva controle, comportamento típico de antagonismo competitivo superável, o qual foi quantificado pela razão de CE_{50} (CR) (Figura 19 e Tabela 11). O LDT66 apresentou uma afinidade elevada por α_{1A} -AR ($pA_2 = 3,4$ nM) e assim como para os α_{1D} -AR, este derivado possui o perfil de um típico antagonista competitivo ao apresentar uma inclinação da reta no gráfico de Schild não diferente da unidade (0,84 \pm 0,22) (Tabela 12). A afinidade da tamsulosina (Tabela 10), utilizada como controle positivo, está de acordo com o descrito na literatura (Noble et al., 1997; Kuo et al., 2000).

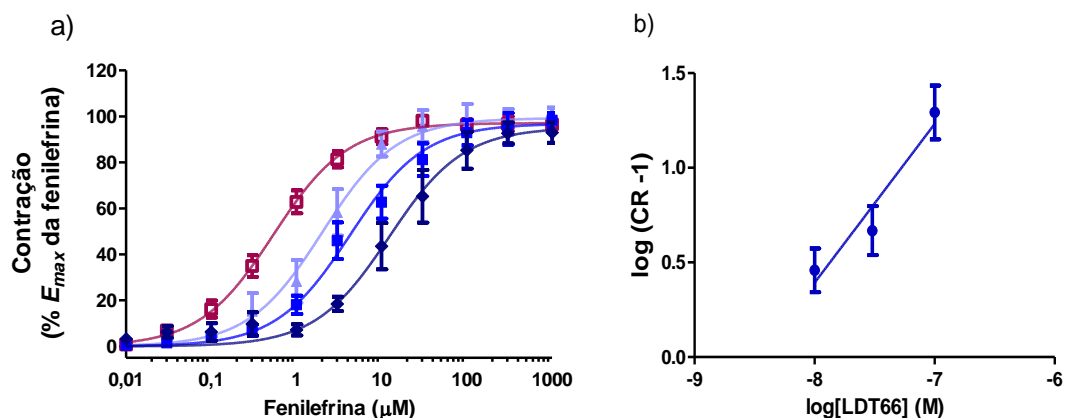


Figura 19: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em próstata de rato na ausência (\square) e presença do LDT66 (\blacktriangle 10, \blacksquare 30 e \blacklozenge 100 nM); b) Regressão de Schild. Dados estão expressos como média \pm EPM de 3-8 experimentos individuais.

Tabela 11: Efeito dos antagonistas de adrenoceptores α_1 nas contrações prostáticas induzidas por fenilefrina

Substâncias	log CE_{50} (M) ^a			
	Controle	Tratado	CR	n
LDT66				
10 nM	-6,18 \pm 0,18	-5,57 \pm 0,18	4,5	7
30 nM	-6,25 \pm 0,16	-5,48 \pm 0,18	6,7	6
100 nM	-6,40 \pm 0,11	-5,08 \pm 0,17	32,5	8
tamsulosina 10 nM	-5,91 \pm 0,04	-3,83 \pm 0,03	121	3

^a Valores médios de log CE_{50} . O CR (razão entre as CE_{50} na presença e ausência da substância teste) é a média dos CR's calculados a partir dos CE_{50} individuais calculados por regressão não linear.

Tabela 12: Afinidade de antagonistas por adrenoceptores α_{1A} nativos de próstata de rato

Substância	K_B (nM)	
	$[pK_B \pm EPM]$	Inclinação
LDT66	3,40 ^a	0,84 \pm 0,22
tamsulosina	0,08 [10,08 \pm 0,02]	-

^a Calculado a partir do valor de pA_2 obtido pela regressão de Schild. O valor de K_B da tamsulosina foi calculado a partir da equação de Schild, em razão de ter sido testada uma única concentração (10 nM). Os valores de pK_B expressam a média e EPM de 3-8 experimentos realizados em triplicata.

4.5 Ensaios *in vivo*

Considerando que o derivado LDT66 é um antagonista de alta afinidade por α_{1A} -AR, α_{1D} -AR e por receptores 5-HT_{1A}, e baixa afinidade pelo α_{1B} -AR, ele apresenta características farmacológicas adequadas a um novo protótipo candidato à fármaco para o tratamento da HPB. Desta forma, nesta etapa foram realizados ensaios *in vivo*.

4.5.1. Efeito do derivado LDT66 sobre a pressão arterial de rato

Foram avaliadas alterações na pressão arterial média de ratos Wistar anestesiados após a administração em bolus da substância. Para fins de comparação, foi utilizado antagonista α_1 -AR não seletivo (prazosina) e um antagonista seletivo para α_{1A} -AR (tamsulosina).

A pressão arterial média (PAM) antes da administração i.v. dos antagonistas α_1 -AR foi de 129 \pm 2,9 mmHg (n = 11), a qual está de acordo com a literatura para este modelo animal (Schleiffer et al., 1991). A PAM começou a reduzir logo após a administração em bolus dos diferentes antagonistas, em todos os experimentos. Na dose de 100 μ g/kg, o derivado LDT66 exerceu discreto efeito hipotensivo, comparável ao da tamsulosina porém menor que o da prazosina (P < 0,001) (Figura 20). O veículo (salina) não alterou a PAM (dados não mostrados).

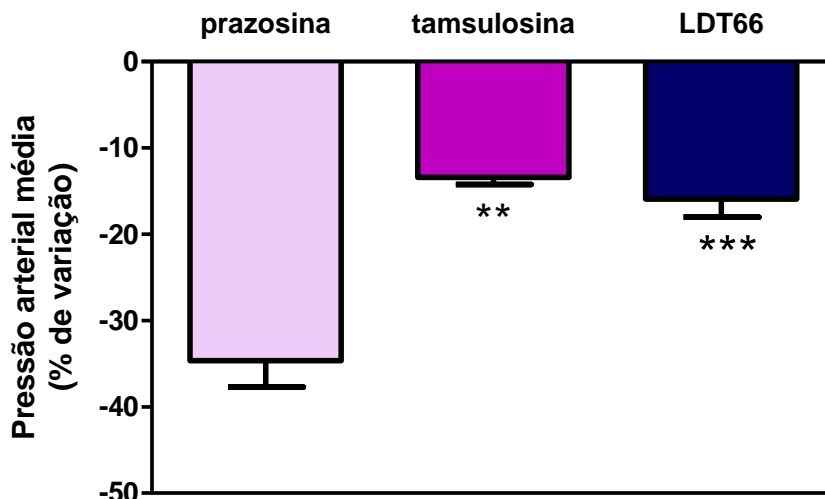


Figura 20: Efeito do LDT66 sobre a pressão arterial média de rato. Prazosina e tamsulosina foram usadas como controle. As substâncias foram administradas em bolus na dose de (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.). Os dados foram expressos como média \pm EPM de 3-4 animais para cada condição. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em relação à prazosina. Resultados foram analisados pelo teste de ANOVA *one-way* seguido de teste *post hoc* de Newman Keuls.

4.5.2. Efeito do derivado LDT66 sobre a pressão intra-uretral elevada

A fenilefrina (i.v. em bolus) administrada em ratos anestesiados induziu o aumento da pressão intra-uretral de maneira dependente da dose com DE_{50} (dose necessária para se alcançar 50% do efeito) de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Figura 21), semelhante ao observado por Akyiama e colaboradores (1999).

O derivado LDT66 foi capaz de reduzir *in vivo* o aumento da pressão intra-uretral induzido pela fenilefrina na dose de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 22).

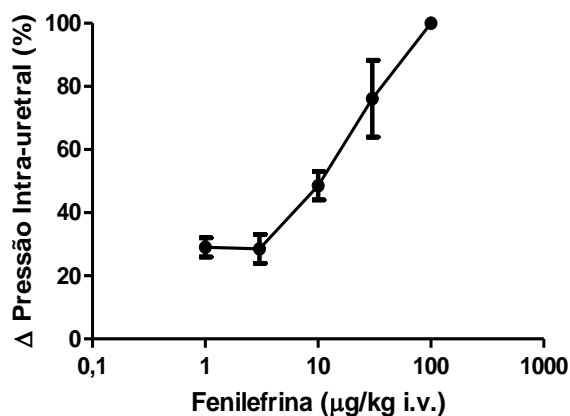


Figura 21: Efeito da fenilefrina sobre a pressão intra-uretral de rato anestesiado. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 4 animais.

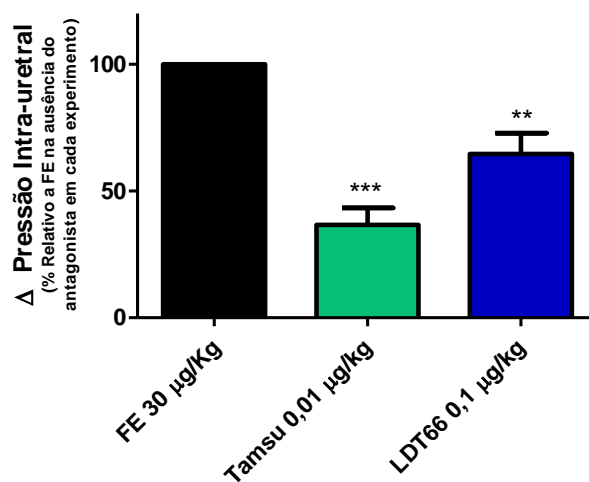


Figura 22: Efeito do derivado LDT66 sobre o aumento da pressão intra-uretral induzido por FE 30 µg/kg. Tamsulosina foi usada como controle 0,01 µg/kg. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 3-4 animais. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ em relação à FE. Resultados foram analisados pelo teste de ANOVA *one-way* seguido de teste *post hoc* de Newman Keuls.

4.5.3. Avaliação do LDT66 sobre temperatura corporal e comportamento

Em vista de possíveis interações *in vivo* com receptores ao nível periférico e/ou central, é preciso avaliar a existência de potenciais efeitos adversos.

Nesta avaliação preliminar foram medidas a temperatura corporal nos grupos de animais tratados com LDT66, e também os demais LDTs (65, 67 e 68) nas doses 10 (Figura 23) e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 24), sendo a última dose igual à dose utilizada no ensaio de PAM. Os dados foram comparados com grupo que recebeu salina (controle). Não foram observadas mudanças significativas de temperatura corporal dentre os grupos (Figuras 23 e 24).

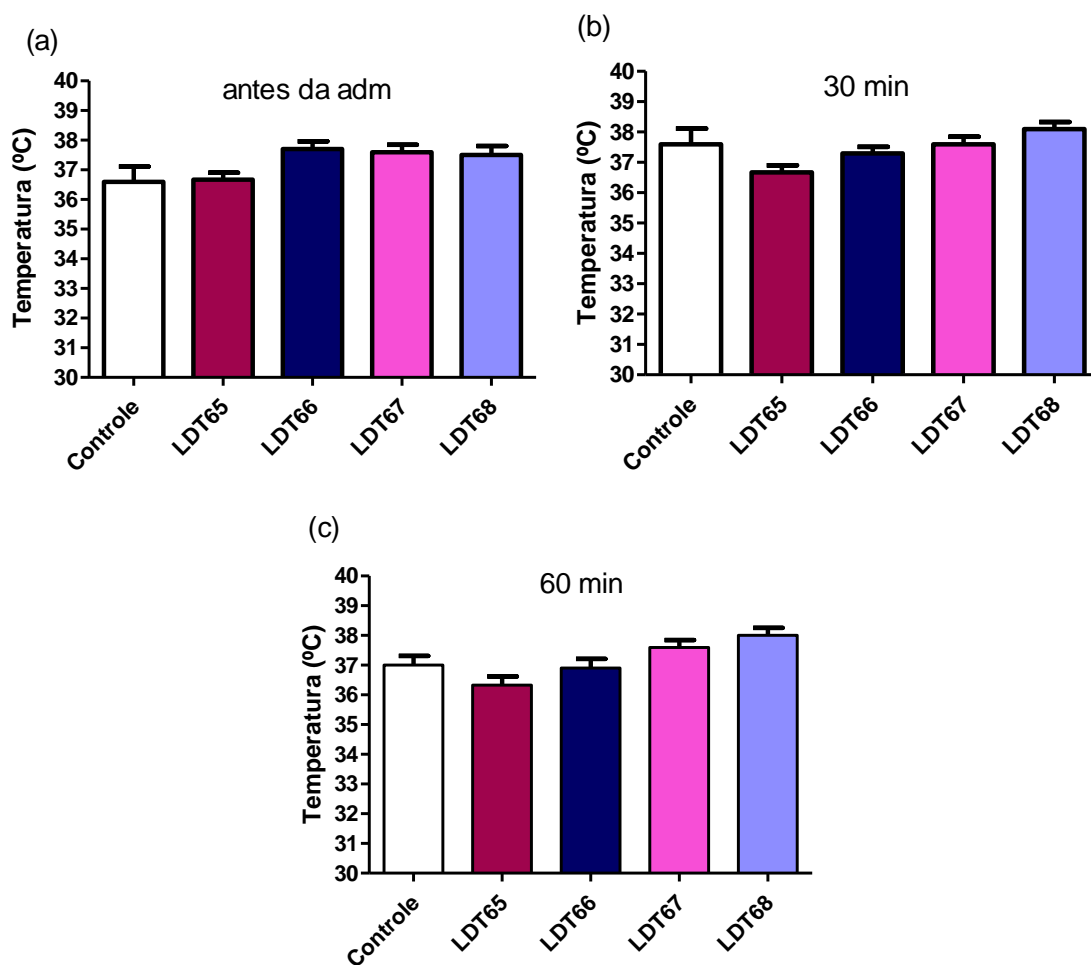


Figura: 23: Efeito dos LDTs sobre a temperatura corporal de camundongos. Antes da administração (adm) (a); 30 minutos (b) e 60 minutos (c) após dose única (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) de LDT65-LDT68 (n = 5 -10). Controle tratado com veículo. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA *one-way* seguido de teste *post hoc* de Dunnett. Antes da adm = antes da administração.

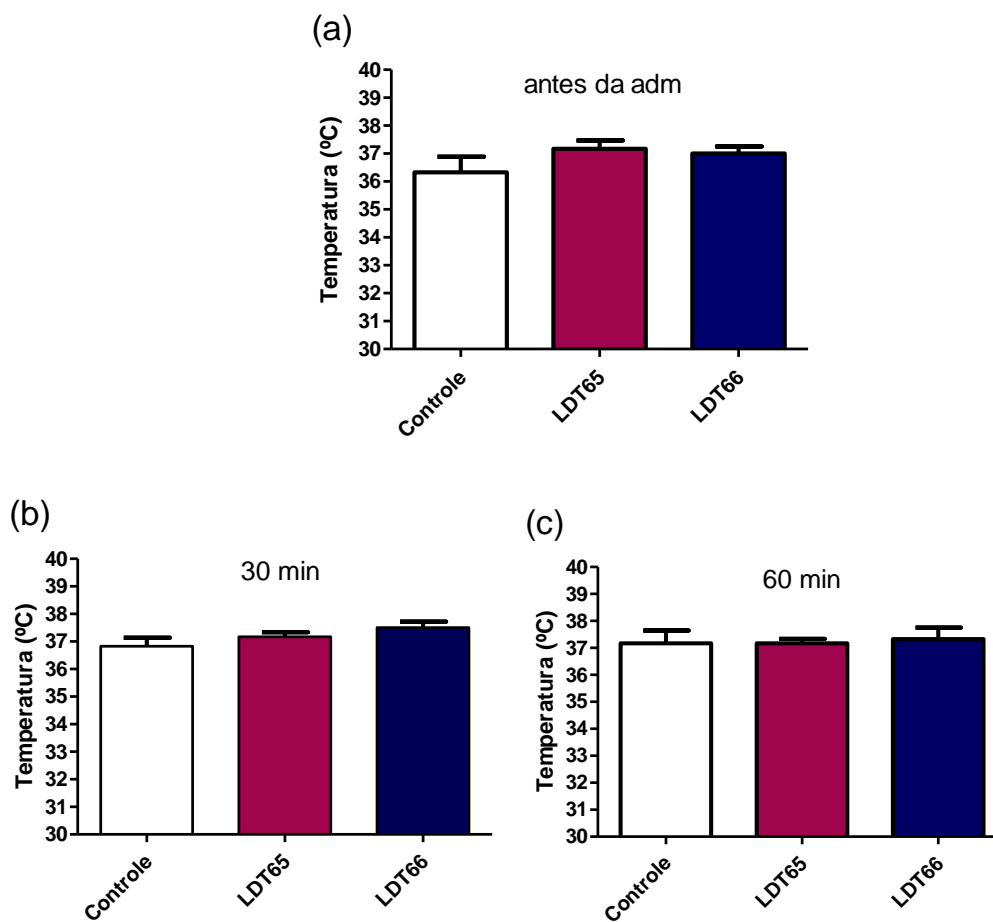


Figura 24: Efeito dos LDTs sobre a temperatura corporal de camundongos. Antes da administração (a), 30 minutos (b) e 60 minutos (c) após dose única (100 µg/kg, i.p.) de LDT65 e LDT66 (n = 6). Controle tratado com veículo. Resultados foram analisados pelo teste de ANOVA *one-way* seguido de *teste post hoc* de Dunnett. Antes da adm = antes da administração.

Também foram avaliados parâmetros de comportamento descritos na tabela abaixo. Não foram observadas alterações do estado de atenção e bem estar, coordenação motora, tônus muscular e respiração no período de até 14 dias em função do tratamento com LDT65 e LDT66 (100 µg/kg, via i.p.). Também não observamos sinais de agitação ou imobilidade, lacrimejamento, ereção de pelo, diarreia ou micção excessiva. Também não houve mortes no período de tratamento.

4.6. Efeito do LDT66 sobre o crescimento de células prostáticas humanas

As células DU-145 (células tumorais de próstata humana; tumor androgênio-independente) expressam α_{1D} -AR e receptores 5-HT_{1A} que estão relacionados com a proliferação, assim como nas células derivadas de HPB (Dizeyi et al., 2011, Shinka et al., 2011, Kojima et al., 2009, Siddiqui et al., 2006).

Para determinar se o LDT66 seria capaz de controlar o crescimento das células DU-145 e HPB induzido por fenilefrina e 5-HT, avaliamos o crescimento celular através dos ensaios de MTT e exclusão do azul de Trypan (apenas para DU-145), antes e após estímulos com os agonistas (seção 3). BMY7378 (antagonista seletivo do α_{1D} -AR) e *p*-MPPF (antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}) foram utilizados como controles positivos.

Tanto a fenilefrina 3 μ M (Figura 25a, 25c e 26a), quanto a 5-HT 1 μ M (Figura 25b, 25d e 26b) foram capazes de estimular o crescimento das células prostáticas em cultura em 40-100% após 48h. O tratamento com LDT66 50 nM (48h) reduziu o crescimento celular induzido pela fenilefrina (Figura 20a, 20c e 21a). Da mesma forma, o LDT66 bloqueou o crescimento celular induzido por 5-HT (Figura 20b, 20d e 21b).

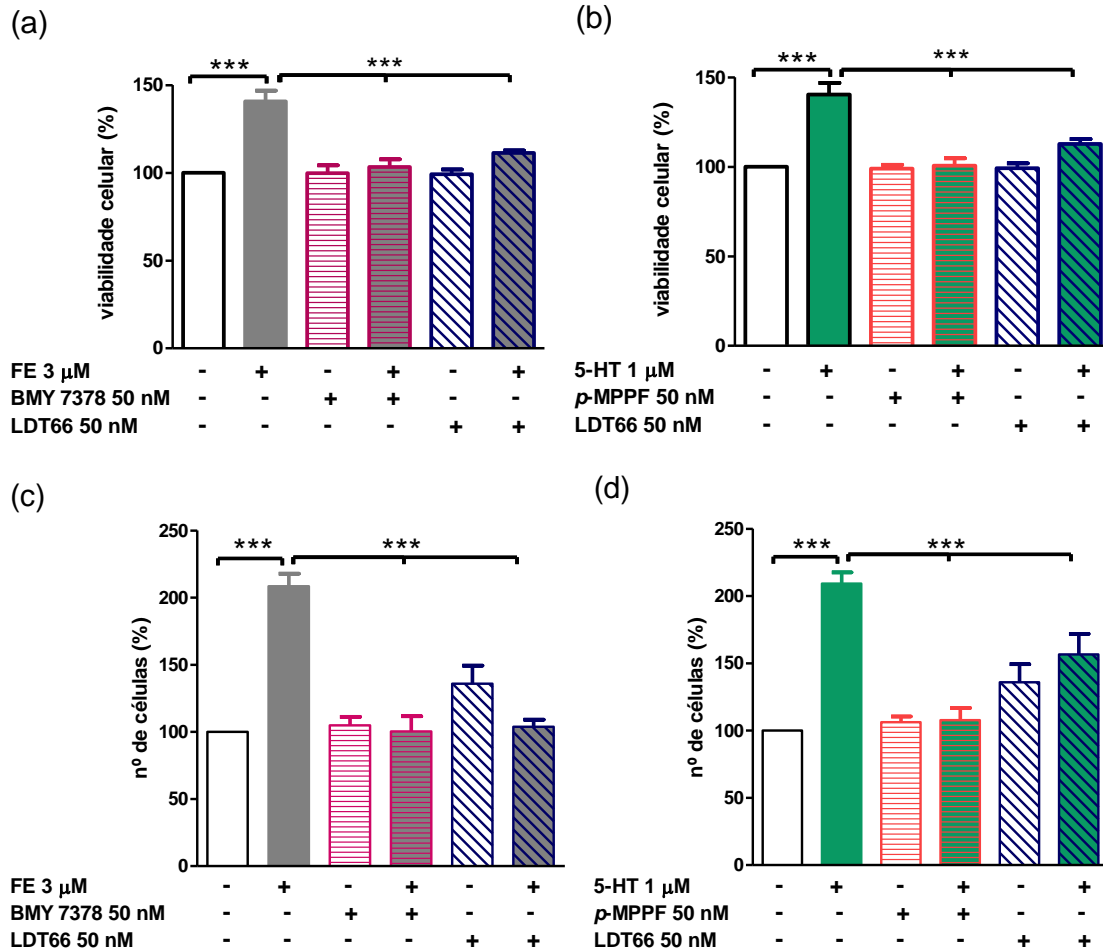


Figura 25: Inibição do efeito proliferativo de fenilefrina e 5-HT pelo LDT66 sobre células prostáticas humanas (DU-145). A viabilidade celular foi medida através do ensaio de MTT após tratamento por 48 h (a, b). A contagem de células viáveis foi realizada pelo ensaio de exclusão do azul de Trypan (c, d). O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3 μ M (FE; a, c) ou 5-HT 1 μ M (b, d). Os experimentos foram realizados em quintuplicata ($n = 5$, MTT) ou triplicata (Trypan blue). As substâncias (LDT66, BMY7378, *p*-MPPF) foram adicionados na concentração de 50 nM, 30 minutos antes dos agonistas e mantidos por 48h. *** $P < 0.001$ comparado ao controle (veículo), 5-HT ou FE, analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls.

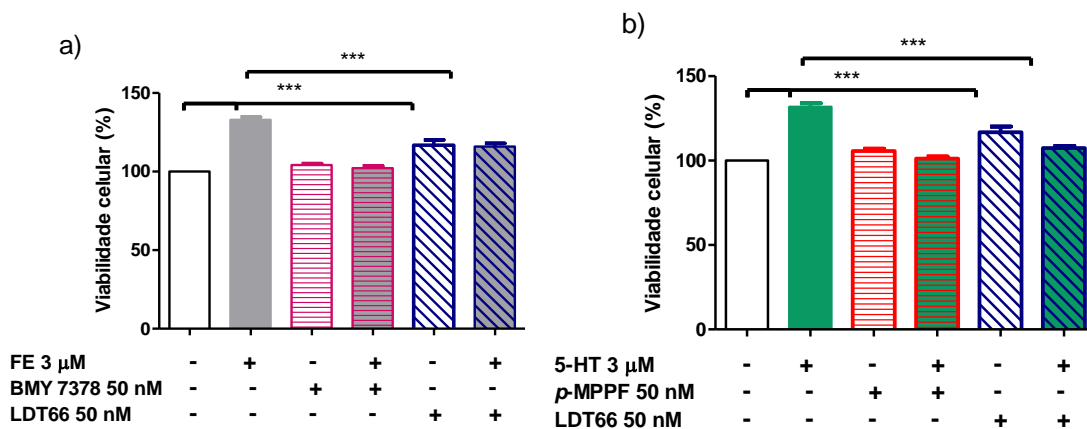


Figura 26: Inibição do efeito proliferativo de fenilefrina e 5-HT pelo LDT66 sobre células estromais de HPB. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de MTT após tratamento por 48 h (a, b). O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3 μ M (FE; a, c) ou 5-HT 3 μ M (b, d). Os experimentos foram realizados em quintuplicata (n = 5, MTT). As substâncias (LDT66, BMY7378, *p*-MPPF) foram adicionados na concentração de 50 nM, 30 minutos antes dos agonistas e mantidos por 48h. *** $P < 0.001$ comparado ao controle (veículo), 5-HT ou FE, analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls.

5. Discussão

Químicos medicinais perceberam há algumas décadas que fármacos possuem características físico-químicas comuns entre si, de tal forma que foram criados alguns filtros teóricos possibilitando a seleção de substâncias a serem testadas em um *pipe-line* de programa de descoberta de novos fármacos (Ghose et al., 1999; Lipinski et al., 2001, Hopkins et al., 2014). Atualmente, até 10 milhões de compostos disponíveis comercialmente são filtrados por essas regras antes do uso em um projeto de desenvolvimento de fármacos (Fukunishi e Nakamura, 2011).

Os derivados LDT65 – LDT68 são candidatos com potencial atividade por via oral, prevendo um bom perfil farmacocinético e perfil adequado para candidatos à protótipos *drugability* (Cumming et al., 2013), e dentro desta série o derivado LDT66 se destaca desta série por apresentar maior afinidade pelos receptores 5-HT_{1A} e α_{1A} -AR.

A sequência de aminoácidos presente nas regiões transmembranares do receptor 5-HT_{1A} apresenta um alto grau de similaridade (ou seja, resíduos de aminoácidos idênticos em posições sequenciais que atingem percentual igual ou maior que 30%), com a sequência dos α_1 -RA (Trump-Kallmeyer et al., 1992; López-Rodríguez et al., 2004), dificultando o desenvolvimento de ligantes seletivos.

Desta forma, muitas substâncias possuem afinidade semelhante para α_1 -AR e receptores 5-HT_{1A}, dentre as quais os derivados *N*-fenilpiperazínicos (Glennon *et al.*, 1993) incluindo os aqui estudados.

Os receptores 5-HT_{1A} são expressos em células de HPB humana e em células neuroendócrinas prostáticas de biópsias de paciente com HPB (Dizeyi et al., 2004). Além disso, receptores 5-HT_{1A} são expressos em células do sistema imune (Cloëz-Tayarani et al., 2004) e poderiam participar do processo inflamatório, o qual é altamente associado à HPB e STUI (Bostanci et al., 2013). A 5-HT tem papel fundamental na proliferação celular e expressão gênica sugerindo um efeito autócrino (Cockett et al., 1993; Dizeyi et al., 2004; Jorgensen, 2007). Somando-se a isto, pesquisadores têm mostrado que o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} pode promover efeito anti-proliferativo em células de HPB (Dizeyi et al., 2004) aumentando a importância do conhecimento da atividade intrínseca das substâncias em estudo.

A atividade intrínseca de fármacos atuando no receptor 5-HT_{1A}, um tipo de *GPCR*, pode ser determinada através de ensaios de *binding* funcional utilizando a razão de *K_i* de ligantes que diferenciem entre os estados de alta e baixa afinidade do receptor (Assié et al., 1999; Noël et al., 2014). Outra forma de estudo da atividade intrínseca é uso do *binding* de [³⁵S]-GTPγS (análogo estável do GTP). LDT65 a LDT68 apresentaram razão de *K_i* próxima a 1, o que sugere que estes derivados *N*-fenilpiperazínicos são antagonistas dos receptores 5-HT_{1A}. No caso do LDT66, esta hipótese foi reforçada ao verificar que o mesmo não estimulou a ligação do [³⁵S]-GTPγS. Desta forma, concluímos que LDT65 a LDT68 são antagonistas dos receptores 5-HT_{1A}.

Além disso, LDT65 – LDT68 apresentam maior afinidade por estes receptores que o derivado *N*-feilpiperazínico naftopidil (*K_i* = 108 nM; Borbe et al., 1991). Embora a tamsulosina também possua alta afinidade para os receptores 5-HT_{1A} e α_{1A}-AR (0,74 e 0,14 nM, respectivamente) (Giuliano et al., 2006; Andersson et al., 2003), ela não possui efeito anti-proliferativo sobre as células prostáticas (Anglin et al., 2002; Kojima et al., 2009). De fato sua atividade intrínseca nos receptores 5-HT_{1A} ainda não foi determinada.

Uma vez que os derivados *N*-fenilpiperazínicos possuem alta afinidade por α_{1A/D}-AR e baixa afinidade por α_{1B}-AR, além dos outros receptores não-alvos citados anteriormente (Tabela 12), fez-se necessário determinar a atividade intrínseca em mais dois receptores relacionados à patofisiologia da HPB: α_{1A}-AR e α_{1D}-AR. Nesta nova etapa aprofundamos as características farmacológicas do LDT66, derivado considerado mais promissor dentre os demais, já que é necessário que tenha atividade antagonista nestes receptores.

No ensaio funcional na próstata e aorta de rato, e nas concentrações utilizadas (até 100 nM), o derivado LDT66 não alterou a linha basal quando adicionado ao sistema, por isso, descartou-se um possível efeito agonista dos α₁-AR, ou ainda dos receptores serotoninérgicos, no caso da aorta, uma vez que também são encontrados receptores 5-HT_{2A} mediando a contração neste tecido (Florian e Watts, 1998, Banes et al., 1999).

O LDT66 mostrou ser um antagonista competitivo dos α_{1D}-AR por deslocar as curvas concentração-resposta em tecidos da aorta (Marshall et al., 1995), paralelamente e para direita, obtendo-se inclinação da reta não diferente de 1,0 na regressão de Schild. A afinidade obtida encontra-se na faixa nM (*K_B*

= 2,18 nM), similar às afinidade descritas para outras *N*-fenilpiperazinas como o BMY 7378 e naftopidil, fármaco aprovado no Japão para o tratamento da HPB (Muramatsu et al., 1991; Goetz et al., 1995; Kenny et al., 1995; Bautista et al., 2006). No estudo anterior havíamos estimado preliminarmente a afinidade dos LDTs por α_{1D} -AR usando uma única concentração (50 nM) de cada substância. O K_B encontrado neste trabalho (via regressão de Schild) foi semelhante à afinidade aparente (K_B) estimada anteriormente através da equação de Schild (1,66 nM) (Chagas-Silva, 2010).

O LDT66 é um antagonista competitivo dos α_{1A} -AR em ensaio funcional da próstata. A análise dos dados revelou que a inclinação da reta na regressão de Schild não foi diferente de 1,0 e o valor de K_B encontrou-se na faixa nM (K_B = 3,4 nM). Esta faixa de afinidade do LDT66 corrobora os dados prévios obtidos em ensaios de competição com [³H]-prazosina pelos sítios de alta afinidade utilizando preparações de fígado de coelho enriquecidas em α_{1A} -AR (Murata et al., 1999, Chagas-Silva, 2010). Contudo naquele ensaio não havia sido possível determinar a atividade intrínseca. Desta forma, concluímos que LDT66 é um antagonista competitivo de alta afinidade dos α_{1A} -AR.

Tabela 12: Parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores não-alvos.

LDTs	K_i (nM) ^a	K_i (nM)	K_i (nM) ^b	K_i (nM)	CI_{50} (nM)
	α_{1B} -AR	α_{2A} -AR	5-HT _{2A}	D _{2-like}	M
65	277	1500	2929	125	460000
66	218	800	1724	122	133000
67	109	500	1891	33	70000
68	168	600	1468	27	34000

^{a,b} Afinidades foram determinadas durante o mestrado através de ensaios de competição, utilizando a [³H]-prazosina e [³H]-ketanserina como radioligantes para α_{1B} -AR e 5-HT_{2A}, respectivamente. (Chagas-Silva, 2010).

Os valores de afinidade do LDT66 para os α_{1A} -AR, α_{1D} -AR e receptores 5-HT_{1A} encontram-se dentro da faixa de afinidade apresentada pela maioria dos fármacos em uso clínico, os quais apresentam afinidade na faixa nanomolar de concentração, com valor médio de K_i de 20 nM.

Como de praxe em projeto de desenvolvimento de fármacos baseado em alvo molecular definido, após ter identificado substâncias ligantes (“hits”) e ativas em alguns ensaios *in vitro*, é necessário comprovar a atividade em algum modelo animal da doença a ser tratada a fim de se eleger um protótipo (“lead compound”).

Em função da localização da próstata humana diferir em outros animais, no caso da HPB não há um modelo animal que reproduza as características hiperplásicas e de STUI. Contudo, os ensaios de medida de pressão intra-uretral são utilizados para estimar a potência de novos fármacos *in vivo* (Hieble, 2011).

O método de avaliação da pressão intra-uretral em ratos se baseia no fato de que o aumento da pressão intra-uretral induzida por fenilefrina, agonista α_1 -AR seletivo, ser primariamente dependente do aumento do tônus muscular liso prostático e, em menor grau, do músculo uretral (Akiyama et al. 1999), através dos subtipos α_{1A} -AR. Nesse sentido, é possível se verificar o papel de um antagonista α_{1A} -AR sobre este modelo.

Após administração intravenosa do derivado LDT66 (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) houve redução do aumento da pressão intra-uretral induzido por fenilefrina em dose submáxima (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v). A tamsulosina (0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, via i.v.) também bloqueou parcialmente o efeito da fenilefrina, sendo utilizada como controle positivo. Portanto, o LDT66 inibiu a contração prostática *in vivo* mediada por α_{1A} -AR, sugerindo, portanto, possível aplicabilidade no tratamento da HPB.

No tratamento de pacientes com HPB sintomática, utilizando antagonistas α_1 -AR, a ocorrência da hipotensão ortostática é um efeito adverso frequente devido ao antagonismo de α_{1B} -AR em vasos sanguíneos de resistência, principalmente em idosos (Take et al., 1998; Schwinn e Michelotti, 2000; Nanda et al., 2009).

Para os ensaios de pressão arterial utilizamos uma dose de LDT66 1000 vezes maior do que a usada nos ensaios de pressão intra-uretral. Ao compararmos o efeito de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LDT66, tamsulosina e prazosina

antagonista α_1 -AR não seletivo, sobre a pressão arterial média, verificou-se um discreto efeito hipotensivo do LDT66 se comparado à prazosina, e um efeito similar ao da tamsulosina, a qual é o padrão ouro no tratamento da HPB na clínica pela menor incidência de eventos hipotensivos. Logo, sugere-se que o LDT66 por ser um antagonista $\alpha_{1A/D}$ -AR seletivo, assim como a tamsulosina, tem uma baixa probabilidade de causar tal efeito adverso.

A 5-HT, assim como agonistas de α_{1D} -AR, tem um papel fundamental na proliferação celular, diferenciação de tumores e expressão de genes (Zhong e Minneman, 1999; Michelotti et al., 2000; Dizeyi et al. 2004, 2011). Uma vez que foi descoberta a expressão do receptor 5-HT_{1A} em células da próstata humana, em biopsias de pacientes com HPB, e em linhagens de células tumorais prostáticas (Dizeyi et al., 2004) e foi verificada a inibição da proliferação de células DU-145 via antagonismo seletivo dos receptores 5-HT_{1A} (Dizeyi et al., 2004), bem como dos α_{1D} -AR (Kojima et al., 2009), entende-se a importância de antagonistas destes receptores para o tratamento da HPB (Dizeyi et al 2004; Siddiqui et al 2006).

Mediante a definição do derivado LDT66 como antagonista competitivo de alta afinidade dos receptores 5-HT_{1A} e $\alpha_{1A/D}$ -AR, o próximo passo foi avaliar o perfil farmacológico deste derivado *N*-fenilpiperazínico em relação às células HPB e DU-145. O derivado LDT66 teve um discreto efeito proliferativo, porém, quando na presença do estímulo serotoninérgico, ele inibiu o crescimento celular quando promovido pela 5-HT, de maneira similar ao bloqueio exercido pelo antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}, p-MPPF. Da mesma forma, o LDT66 bloqueou o crescimento das células estimulado pela fenilefrina como observado na presença do BMY7378, antagonista seletivo dos α_{1D} -AR. Mediante estes dados, sugere-se que a proliferação das células HPB e DU-145 observada via estímulo com 5-HT e fenilefrina por 48 horas, ocorre via receptores 5-HT_{1A} e α_{1D} -AR e que o LDT66 pode oferecer uma vantagem em relação à tamsulosina no tratamento da HPB, na medida em que poderia aliviar os STUI e lentificar o crescimento exacerbado da próstata característico da HPB.

Como mencionado anteriormente, existe uma grande homologia na região transmembranar hidrofóbica dentro do grupo dos *GPCRs*, a qual possibilita o reconhecimento do ligante (Oldham & Hamm, 2008), tornando o

desenvolvimento de ligantes seletivos um desafio. Todos os ligantes endógenos conhecidos destes receptores são estruturalmente relacionados a pequenas moléculas de aminas com um anel aromático simples (Fredriksson et al., 2003). Assim, muitos fármacos utilizados na clínica exibem alta afinidade por outros receptores de monoaminas que não são alvos de fato. Ademais, em vista da extensa distribuição sistêmica destes receptores, a interação entre fármaco e receptor não-alvo pode resultar em efeitos adversos, razão pela qual também avaliamos a afinidade dos nossos compostos para alguns destes receptores.

O α_2 -AR faz parte de um dos três ramos da árvore filogenética dos adrenoceptores que apresentam sequências de aminoácidos transmembranar com similaridade superior a 45% em relação aos α_1 -AR, ao se alinhar as regiões comuns aos *GPCRs* (Fredriksson et al., 2003). As afinidades dos derivados *N*-fenilpiperazínicos foram verificadas para o subtipo α_{2A} -AR, por estar relacionado com a regulação dos sistemas cardiovascular, genitourinário masculino e nervoso central, onde receptores pré-sinápticos inibem a liberação de catecolamina a partir dos nervos simpáticos (Lefèvere-Borg et al., 1993; Hein et al., 1999; Michel e Vrydag, 2006; Kontani et al., 2000; Andersson et al., 2004). No tratamento da HPB, a razão de seletividade entre esses receptores é um fator importante na determinação da utilidade clínica entre antagonistas de α -adrenoceptores.

As afinidades dos derivados LDT65 – LDT68 não diferiram entre si, sugerindo que as diferenças estruturais não influenciam nas afinidades pelo subtipo α_{2A} -AR. Os LDTs apresentaram menor afinidade em relação aos $\alpha_{1A/D}$ -RA (tabela 13). O LDT66, por exemplo, apresentou uma afinidade 19 vezes maior para α_{1A} e 482 vezes maior para α_{1D} -AR em relação ao α_2 -AR, tendo uma boa seletividade entre os receptores, o que sugere uma menor propensão a causar efeitos adversos relacionados aos α_{2A} -AR.

Tabela 13: Parâmetros farmacológicos dos LDTs em α_{2A} -AR nativos de córtex de rato.

LDTs	α_{2A}	α_{2A}/α_{1A} ^a	α_{2A}/α_{1D} ^b
	K_i (μ M)	K_i/K_i	K_i/K_B
LDT65	1,5	22	181
LDT66	0,8	19	482
LDT67	0,5	6	275
LDT68	0,6	16	138

^{a,b} Os valores de K_i para $\alpha_{1A/D}$ -AR foram obtidos durante o mestrado. (Chagas-Silva et al., 2010)

Considerando que muitos ligantes dos receptores 5-HT_{1A}, além de terem alta afinidade por α_1 -AR, também apresentam alta afinidade para receptores dopaminérgicos D₂ (López-Rodríguez et al., 2002; Fiorino et al., 2005), avaliamos as afinidades dos LDTs pelos receptores D_{2-like} (englobam os subtipos D₂, D₃ e D₄). Dentre a série estudada, os LDT67 e LDT68 tiveram a maior afinidade para este receptor D_{2-like} ($K_i = 33$ e 27 nM, respectivamente), sugerindo que a interação hidrofóbica de *N*-fenilpiperazinas substituídas com estes receptores é favorecida pela alteração do substituinte. Vale ressaltar que o LDT66 tem afinidade menor para o receptor D_{2-like} ($K_i = 122$ nM) do que para o receptor α_{1A} ($K_i = 43$ nM), apresentando uma razão de seletividade de ~ 3 . Esta razão embora pequena poderia ser considerada aceitável já que a tamsulosina, antagonista α_{1A} -AR utilizado no tratamento da HPB, tem afinidades ainda mais próximas para os receptores D₃ e α_{1A} -AR (0,28 e 0,14 nM, respectivamente) (Giuliano et al., 2006; Andersson et al., 2003). Por outro lado, a menor afinidade de LDT65 e LDT66 em relação aos LDT67 e LDT68 é uma característica favorável das substâncias, já que o bloqueio de vias dopaminérgicas centrais poderia causar parkinsonismo, hiperprolactinemia e discinesia tardia (Roth et al., 2004; Richtand et al., 2007; López-Muñoz e Álamo, 2011). Ademais, ao nível periférico, este bloqueio poderia estar relacionado à deterioração da função renal associado à idade, e ao desenvolvimento de hipertensão e diabetes (Doggrell, 2002).

Com relação aos receptores muscarínicos, a afinidade dos LDTs parece aumentar conforme o aumento da hidrofobicidade da molécula. Contudo, os derivados LDTs apresentaram afinidade reduzida pelos receptores muscarínicos. Embora o [³H]-QNB seja um ligante não seletivo dos receptores muscarínicos, e a preparação de córtex cerebral de rato utilizada no estudo expresse os cinco subtipos de receptores, ela contem maior proporção (40%) de RNAm dos receptores M₁ (Krejci e Tucek, 2002), logo sugerimos que LDT65 a LDT68 tem baixa afinidade por receptores M₁. Tendo em vista que o bolsão de ligação ao sítio ortostérico da família do receptor muscarínico é altamente conservado, com 40-50% de identidade (Fredriksson et al., 2003), até hoje não são encontrados ligantes com alta seletividade (IUPHAR) dentro desta família, sugerindo que a baixa a afinidade apresentada pelo subtipo M₁ é comum aos demais subtipos (M₂-M₅, permanecendo ainda na faixa μM) (tabela 13). Portanto, de uma maneira geral, assegura-se um baixo risco de efeitos adversos cardiovasculares, glandulares, constipação e sonolência, por exemplo (Andersson, 2004; Yamada et al., 2011).

A seletividade farmacológica proporciona vantagens clínicas. Segundo alguns autores como Lepor (2006) é preciso que se tenha uma razão de seletividade acima de 10 vezes entre diferentes receptores. Segundo este princípio, todos os LDTs tem ótima razão de seletividade entre os α_{1A/1D}-AR e receptores M (Tabela 14). Além disso, LDT65 e LDT66 se destacam com as maiores razões de seletividade.

Tabela 14: Parâmetros farmacológicos dos LDTs em receptores muscarínicos nativos de córtex de rato.

	M	M/α_{1A}^a	M/α_{1D}^b
LDTs	K_i (μM)	K_i /K_i	K_i /K_B
LDT65	172	2567	20673
LDT66	54	1255	32530
LDT67	21	259	11538
LDT68	11	289	1263

^{a,b} Os valores de K_i para α_{1A/D}-AR foram obtidos durante o mestrado. (Chagas-Silva, 2010)

Comparando-se as afinidades estimadas (Tabela 12) entre os diferentes receptores não-alvos já estudados, *i.e.*, receptores muscarínicos, 5-HT_{2A}, D₂, α₂-AR e α_{1B}-AR, verifica-se que os derivados LDT65 e LDT66 apresentaram menor afinidade em relação aos demais LDTs, sendo, portanto, potenciais candidatos a protótipos para o tratamento da hiperplasia prostática benigna.

Há consenso quanto à necessidade de se ter cada vez mais cedo algumas informações sobre a potencial toxicidade de novas substâncias para evitar investimento de tempo e dinheiro em substâncias em fase de desenvolvimento.

Dentro dos parâmetros avaliados (seção 3.12), não houveram sinais de alteração do sistema nervoso central e autônomo e nem morte dos roedores no período de até 14 dias após tratamento com os LDTs, embora em doses únicas dos LDT65 – LDT68 e doses únicas doses 10 vezes mais elevadas (LDT65 e LDT66), corroborando a baixa afinidade destes pelos receptores não alvos avaliados *in vitro* (seção 5.7). Apesar de muito preliminares, estes resultados podem descartar uma toxicidade aguda destes derivados, permitindo levar o projeto adiante com maior segurança.

Considerando as características farmacológicas do LDT66 incluindo a regra dos 5 de Lipinsky, e o fato de possuir alta afinidade e atividade intrínseca nos receptores relevantes na patofisiologia da HPB, bloquear a contração prostática *in vivo*, ter ausência de efeito hipotensor significativo e inibição das células HPB, sugere-se que o LDT66 é um novo potencial candidato a protótipo no tratamento da HPB.

6. Conclusões

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos LDT65 e LDT66 são antagonistas multialvos com alta afinidade pelos 5-HT_{1A}, α_{1A}-AR e α_{1D}-AR, os quais são relevantes para o tratamento da HPB sintomática. De acordo com modelos teóricos, há previsão de boa eficiência de ligação aos receptores 5-HT_{1A}, α_{1A}-AR.

LDT65 e LDT66 se destacaram da série por apresentarem menor afinidade por receptores não-alvo da HPB (M, D2-like, 5-HT_{2A}, α_{1B}-AR, α₂-AR) e não apresentaram toxicidade em ensaio preliminar.

O derivado LDT66 foi identificado como um candidato a protótipo de fármaco para o tratamento da HPB, pois é um antagonista competitivo dos α_{1A}-AR e α_{1D}-AR de alta afinidade e *in vivo* inibe a contração prostática, sem causar hipotensão significativa. Ademais, o derivado LDT66 inibe a proliferação de células HPB humanas. O conjunto de resultados sugere que o LDT66 poderia aliviar os STUI e lentificar o crescimento exacerbado da próstata característico da HPB.

7. Referências

ABDUL, M.; ANEZINIS, P.E.; LOGOTHETIS, C.J.; et al. Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. **Anticancer Res.** 14: 1215–1220, 1994.

ABDUL, M.; LOGOTHETIS, C.J.; HOOSEIN, N.M. Growth inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines. **J. Urol.** 154: 247-250, 1995.

AKIYAMA, K.; HORA, M.; TATEMACHI, S.; et al. KMD-3213, a uroselective and long-acting alpha(1a)-adrenoceptor antagonist, tested in a novel rat model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 291: 81–91, 1999.

ALONSO-MAGDALENA, P.; BRÖSSNER, C.; REINER, A.; et al. A role for epithelial-mesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 106: 2859–2863, 2009.

ANDERSSON, K.E.; WYLLIE, M.G. Ejaculatory dysfunction: why all alpha-blockers are not equal. **B.J.U. Int.** 92: 876–877, 2003.

ANDERSSON, K.-E.; WEIN, A. J. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. **Pharmacological reviews** 56 (4): 581–631, 2004.

ANGLIN, I.E.; GLASSMAN, D.T.; KYPRIANOU, N. Induction of prostate apoptosis by α 1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** 5: 88–95, 2002.

ARUNLAKSHANA, O.; AND SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** 14: 48–58, 1959.

ASSIÉ M.B.; COSI C.; KOEK W. Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT(1A) receptors and intrinsic activity. **Eur. J. Pharmacol.** 386: 97–103, 1999.

ASSIÉ M.B.; SLEIGHT A.J.; KOEK W. Biphasic displacement of [3H]YM-09151-2 binding in the rat brain by thioridazine, risperidone and clozapine, but not by other antipsychotics. **Eur. J. Pharmacol.** 237 (2-3): 183–189, 1993.

BANES, A.; FLORIAN, J.A.; WATTS, S.W. Mechanisms of 5-hydroxytryptamine 2A receptor activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 291: 1179–1187, 1999.

BARCLAY W.W.; WOODRUFF R. D.; HALL M.C.; CRAMER S.D. A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Endocrinology** 146: (1): 13–18, 2005.

BAUTISTA, D.L.; MORRIS, D.H.; STEIN, L.; et al. A two model receptor system of the alpha1D adrenergic receptor to describe interactions with epinephrine and BMY7378. **J. Chem. Inf. Model.** 46:334–344. 2006.

BOK, R. A.; SMALL, E.J. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. **Nat. Rev. Cancer** 2: 918–926, 2002.

BORBE, O.H.; METZNAUER, P.; SZELENYI, I. 5-HT1A-agonistic properties of naftopidil, a novel antihypertensive drug. **Eur. J. Pharmacol.** 205:105–107, 1991.

BOSTANCI Y.; KAZAZI A.; MOMTAHEN S.; et al. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. **Curr. Opin. Urol.** 23:5–10, 2013.

BREMNER, J.B.; GRIFFITH, R; COBAN, B. Ligand design for alpha(1) adrenoceptors. **Curr Med Chem.** 8 (6): 607-620, 2001.

BURNET, P.W.; EASTWOOD, S.L.; LACEY, K.; HARRISON, P.J. The distribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNA in human brain. **Brain Res.** 676: 157–168, 1995.

BUSHMAN, W. Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Urol. Clin. North Am.** 36: 403–415, 2009.

CANTRELL, M.A.; BAYE, J.; VOURI, S.M. Tadalafil: A Phosphodiesterase-5 Inhibitor for Benign Prostatic Hyperplasia. **Pharmacotherapy** 33:639–649, 2013.

CAPELA, J.; RUSCHER, K.; LAUTENSCHLAGER, M.; et al. Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. **Neuroscience** 139: 1069-1081, 2006.

CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology** 61: 2–7, 2003.

CASTOLDI, A.F.; COCCINI, T.; RANDINE, G. Lymphocyte cytochrome c oxidase, cyclic GMP and cholinergic muscarinic receptors as peripheral indicators of carbon monoxide neurotoxicity after acute and repeated exposure in the rat. **Life Sciences** 78:1915–1924. 2006.

CHAGAS-SILVA, F. **Avaliação farmacológica de novos antagonistas duais de adrenoceptores $\alpha_{1A/1D}$** . 2010. 112 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2010.

CHAGAS-SILVA, F.; NASCIMENTO-VIANA, J.B.; ROMEIRO, L.A.S.; et al. Pharmacological characterization of N1-(2-methoxyphenyl)-N4-hexylpiperazine as a multi-target antagonist of α_{1A}/α_{1D} -adrenoceptors and 5-HT_{1A} receptors that blocks prostate contraction and cell growth. **Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 387: 225–234, 2014.

CHAPPLE, C.R. Alpha adrenoceptor antagonists in the year 2000: is there anything new? **Curr Opin Urol** 11: 9–16, 2001.

CHAPPLE, C.R.; AUBRY, M.L.; JAMES, S.; et al. Characterisation of human prostatic adrenoceptores using pharmacology receptor binding and localisation. **Br.J. Urol.** 63, 487–496. 1989.

CHEN, Z.; MINNEMAN, K.P. Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. **Acta Pharmacol. Sin.** 26: 1281–1287, 2005.

CHENG, Y.; PRUSOFF, W.H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.** 22: 3099–3108, 1973.

CHRIST, G.J.; ANDERSSON, K.E. Rho-kinase and effects of Rho-kinase inhibition on the lower urinary tract. **Neurourol. Urodyn.** 26:948–954. 2007.

CLOËZ-TAYARANI, I.; KAYYALI, U.S.; FANBURG, B.L.; CAVAILLON, J.M. 5-HT activates ERK MAP kinase in cultured-human peripheral blood mononuclear cells via 5-HT_{1A} receptors. **Life Sci.** 76: 429–443, 2004.

COCKETT, A.T.K.; SANT'AGNESE, P.A.; DI GOPINATH, P.; et al. Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. **Urology** 42: 512–519, 1993.

CUMMING, J.G.; DAVIS, A.M.; MURESAN, S.; et al. Chemical predictive modelling to improve compound quality. **Nat. Rev. Drug Discov.** 12: 948–962, 2013.

DE ALMEIDA, J; MENGOD, G. Serotonin_{1A} receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment. **J. Neurochem.** 107 (2): 488–496, 2008.

DELLA ROCCA, G.J.; VAN BIESEN, T.; DAAKA, Y.; et al. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. **J. Biol. Chem.** 272 (31): 19125–19132, 1997.

DE MARINIS, R.M.; WISE, M; THIEBLE, J.P.; RUFFOLO, R.R. Structure-activity relationships for α 1-adrenergic receptor agonists and antagonists. In Alpha-1 Adrenergic Receptors. R. R. Ruffolo (Ed.). Clifton, USA. **Humana Press Inc.** pp. 211–265, 1987.

DELLA ROCCA, G.J.; MUKHIN, Y. V; Garnovskaya, M.N.; et al.. Serotonin 5-HT 1A Receptor-mediated Erk Activation Requires Calcium / Calmodulin-dependent Receptor Endocytosis . **J. Biol. Chem.** 274: 4749–4753, 1999.

DESIMONE, R.W.; CURRIE K.S.; MITCHELL S.A. Privileged structures: applications in drug discovery. **Comb. Chem. High Throughput Screen** 7 473–494, 2004.

DI SANT'AGNESE, P.A. Neuroendocrine cells of the prostate and carcinoma : a review of morphologic aspects. **Urology** 51: 121–124, 1998.

DIZEYI, N.; BJARTELL, A.; NILSSON, E.; et al. Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. **Prostate** 59: 328–336, 2004.

DIZEYI, N.; BJARTELL, A.; HEDLUND, P.; et al. Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines. **Eur. Urol.** 47:895–900, 2005.

DIZEYI, N.; HEDLUND, P.; BJARTELL, A.; et al. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. **Urol. Oncol.** 29: 436–445, 2011.

DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. **Cell. Mol. Life Sci.** 67: 405–17, 2010.

DOGGRELL, A.S. The therapeutic potential of dopamine modulators on the cardiovascular and renal systems. **Expert Opin. Investig. Drugs** 11: 631–644, 2002.

FARGIN, A.; RAYMOND, J.R.; LOHSE, M.J.; et al. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. **Nature** 335: 358–360, 1988.

FINE, S. R.; GINSBERG, P. Alpha-adrenergic receptor antagonists in older patients with benign prostatic hyperplasia: issues and potential complications. **J. A. O. A.**, 108 (7): 333–337, 2008.

FIORINO, F.; PERISSUTTI, E.; SEVERINO, B.; et al. Nucleus: Synthesis and in Vitro Pharmacological Evaluation. **J. Med. Chem.**, 48: 5495–5503, 2005.

FISCHER, J.R.; LANE, I.F.; CRIBB, A.E. Urethral pressure profile and hemodynamic effects of phenoxybenzamine and prazosin in non-sedated male beagle dogs. **Can. J. Vet. Res.** 67: 30–38, 2003.

FLAVAHAN, N.A.; VANHOUTTE, P.M. α -Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. **Trends Pharmacol. Sci.** 7: 347–349, 1986.

FLORIAN, J.A.; WATTS S.W. Integration of mitogen activated protein kinase kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor signal transduction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 284:346–355, 1998.

FORD, A.P.D.W.; WILLIAMS, T.J.; BLUE, D.R.; CLARKE, D.E. α 1-adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. **Trends Pharmacol. Sci.**; 15: 167–170, 1994.

FORRAY, C.; BARD, J. A.; WETZEL, J. M.; et al. The alpha-1 adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human $\alpha 1C$ subtype. **Mol. Pharmacol.** 45: 703–708, 1994.

FORRAY, C.; NOBLE, S.A. Subtype selective alpha1-adrenoceptor antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Expert Opin. Investig. Drugs.** 8 (12): 2073–2094, 1999.

FREDRIKSSON, R.; LAGERSTRÖM, M.C.; LUNDIN, L.-G.; SCHIÖTH, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. **Mol. Pharmacol.** 63: 1256–1272, 2003.

FUKUNISHI, Y.; NAKAMURA, H. Definition of Drug-Likeness for Compound Affinity. **J. Chem. Inf. Model.** 1012–1016., 2011.

GANDELLINI, P.; PROFUMO, V.; CASAMICHELE, A.; et al. miR-205 regulates basement membrane deposition in human prostate: implications for cancer development. **Cell Death Differ.** 19: 1750–1760, 2012.

GARCIA-SAINZ, J.A.; VAZQUEZ-PRADO, J.; VILLALOBOS-MOLINA, R. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. **Arch. Med. Res.** 30 (6): 449–458, 1999.

GENTILI, C.; MORELLI, S.; RUSSO DE BOLAND, A. Involvement of PI3-kinase and its association with c-Src in PTH-stimulated rat enterocytes. **J. Cell Biochem.** 86 (4): 773–783, 2002.

GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. **J. Combin. Chem.** 1: 55–68, 1999.

GIULIANO, F.A.; CLÉMENT, P.; DENYS, P.; et al. Comparison between tamsulosin and alfuzosin on the expulsion phase of ejaculation in rats. **B.J.U. Int.** 98:876–879, 2006.

GLENNON, R.A. Concepts for the design of 5-HT_{1A} serotonin agonists and antagonists. **Drug Dev. Res.** 26: 251–274, 1993.

GOETZ, A.S.; KING, H.K.; WARD, S.D.C.; et al. BMY 7378 is a selective antagonist of the d subtype of α 1-adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.** 272 (2–3): r5–6. 1995.

GURDAL, H.; SEASHOLTZ, T.M.; WANG, H.Y.; et al. Role of G alpha q or G alpha o proteins in alpha 1-adrenoceptor subtype-mediated responses in Fischer 344 rat aorta. **Mol. Pharmacol.** 52: 1064–1070, 1997.

HAMDI, A ; ONAVI, ES ; PRASAD, C. A low protein-high carbohydrate diet decreases D2 dopamine receptor density in rat brain. **Life Sci.** 50: 152–1534, 1992.

HAMPEL, C.; DOLBER, P.C.; SMITH, M.P.; et al. Modulation of bladder alpha1-adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. **J. Urol.** 167: 1513–1521, 2002.

HARA, N.; MIZUSAWA, T.; OBARA, K.; TAKAHASHI, K. The role of naftopidil in the management of benign prostatic hyperplasia. **Ther. Adv. Urol.** 5: 111–119, 2013.

HARMAN, S.M; METTER, E. J; TOBIN, J. D; et al. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthymen. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 86 (2): 724–731, 2001.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E.; LARSSON, B. Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate. **J. Urol.** 134: 129–1298, 1985.

HEIN, L; ALTMAN, JD; KOBILKA, BK. Two functionally distinct α 2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. **Nature** 402: 181–184, 1999.

HENNENBERG, M.; Stief, C.G.; GRATZKE, C. Prostatic α 1-Adrenoceptors: New Concepts of Function, Regulation, and Intracellular Signaling. **NeuroUrol. Urodyn.** ,2013. doi: 10.1002/nau.22467.

HENNENBERG, M.; STIEF, C.G.; GRATZKE, C. Pharmacology of the lower urinary tract. **Indian J. Urol.** 30: 181–188, 2014.

HENNENBERG, M.; STRITTMATTER, F.; WALTHER, S.; et al. α 1-Adrenoceptor Activation Induces Phosphorylation of β 2-Adrenoceptors in Human Prostate Tissue. **B.J.U. Int.** 108: 922–928, 2011.

HIEBLE, J.P.; CAINE, M.; ZALAZNIK, E. In vitro characterization of the alpha-adrenoceptors in human prostate. **Eur. J. Pharmacol.** 107,111–117, 1985.

HIEBLE, J.P.; BYLUND, D.B.; CLARKE, D.E.; et al. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-Adrenoceptors: consensus update. **Pharmacol. Rev.** 47: 267–270, 1995.

HIEBLE, J.P.; RUFFOLO, R.R. The use of alpha-adrenoceptor antagonists in the pharmacological management of benign prostatic hypertrophy: an overview. **Pharmacol. Res.** 33: 145–160, 1996.

HIEBLE, J.P. Adrenoceptor subclassification: an approach to improved cardiovascular therapeutics. **Pharm. Acta Helv.** 74:163–171, 2000.

HIEBLE, J.P. Animal models for benign prostatic hyperplasia. **Handb. Exp. Pharmacol.** 202:69–79, 2011.

HIRAOKA, Y.; OHMURA, T.; OSHITA, M.; et al. Binding and functional characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat prostate. **Eur. J. Pharmacol.** 366 (1): 119–126, 1999.

HIRAOKA, Y.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, T.; et al. Pharmacological characterization of unique prazosin-binding sites in human kidney. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368: 49–56, 2003.

HOPKINS, A.L.; KESERÜ, G.M.; LEESON, P.D.; et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.** 13: 105–21, 2014.

HU, Z.W.; SHI, X.Y.; LIN, R.Z.; et al. Alpha1-Adrenergic receptor stimulation of mitogenesis in human vascular smooth muscle cells: role of tyrosine protein kinases and calcium in activation of mitogen-activated protein kinase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 290 (1): 28-37, 1999.

HU, Z.W.; SHI, X.Y.; LIN, R.Z.; et al. Contrasting signaling pathways of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor subtype activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH3T3 cells. **Mol. Endocrinol.** (Baltimore, Md.) 13 (1): 3-14, 1999b.

ISHIZUKA, O.; IMAMURA, T.; KURIZAKI, Y.; et al. Male lower urinary tract symptoms and α 1D-adrenoceptors. **Int. J. Urol.** 20: 73–78, 2013.

ISLAM, A.H.M.; KATO, H.; HAYAMA, M; et al. Are Neuroendocrine Cells Responsible for the Development of Benign Prostatic Hyperplasia? **Eur. Urol.** 42: 79–83, 2002.

ITO, H; HALLDIN, C; FARDE, L. Localization of 5-HT_{1A} receptors in the living human brain using [carbonyl-11C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique. **J Nucl. Med.** 40 (1): 102–109, 1999.

ITO, K.; OHTANI, H.; AND SAWADA, Y. Assessment of alpha1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia based on the receptor occupancy theory. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 63: 394–403, 2006.

IUPHAR, Receptor Database. <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward>. Acesso em maio 2014.

JORGENSEN, H.S. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. **Dan. Med. Bull.** 54: 266–288, 2007.

KAPLAN, S. A. alpha-Blocker Therapy: Current Update. **Rev. Urol.** 7 Suppl 8: S34–42, 2005.

KENAKIN, T. Competitive antagonism, em pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. 2nd ed. **Raven Press**, New York. pp: 278–322., 1993.

KENNY, B.A., CHALMERS, D.H., PHILPOTT, P.C., NAYLOR, A.M. Characterization of a α 1D-adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. **Br. J. Pharmacol.** 115: 981–986, 1995.

KENNY, B.A.; MILLER, A.M.; WILLIAMSON, I.J.; et al. Evaluation of the pharmacological selectivity profile of alpha 1 adrenoceptor antagonists at prostatic alpha 1 adrenoceptors: binding, functional and in vivo studies. **Br. J. Pharmacol.** 118: 871–878, 1996.

KENNY, B.; BALLARD., S; BLAGG., J; FOX, D. Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia. **J. Med. Chem.** 40:1293–1315, 1997.

KIRBY, R.S., ROEHRBORN, C., BOYLE, P., et al. Efficacy and tolerability of doxazosin and finasteride, alone or in combination, in treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia: the Prospective European Doxazosin and Combination Therapy (PREDICT) trial. **Urology** 61:119–126, 2003.

KOBILKA, B.K., FRIELLE, T., COLLINS, S., et al. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **Nature** 329:75–79, 1987.

KOJIMA, Y.; SASAKI, S.; KUBOTA, Y.; et al. Up-regulation of α 1a and α 1d-adrenoceptors in the prostate by administration of subtype selective α 1-adrenoceptor antagonist tamsulosin in patients with benign prostatic hyperplasia. **J. Urol.** 186: 1530–1536, 2011.

KOJIMA, Y.; SASAKI, S.; ODA, N.; et al. Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha(1)-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. **Prostate** 69: 1521–1528, 2009.

KOJIMA, Y.; SASAKI, S.; SHINOURA, H.; et al. Quantification of Alpha1-Adrenoceptor Subtypes by Real-Time RT-PCR and Correlation With Age and Prostate Volume in Benign Prostatic Hyperplasia Patients. **Prostate** 66: 761–767, 2006.

KONTANI, H.; TSUJI, T.; KIMURA, S. Effects of adrenergic α 2-receptor agonists on urinary bladder contraction in conscious rats. **Jpn. J. Pharmacol.** 84: 381–390, 2000.

KREJCI, A.; TUCEK, S. Quantitation of mRNAs for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. **Mol. Pharmacol.** 61 (6): 1267–1272, 2002.

KUBO, H.; HAZEKI, K.; TAKASUGA, S.; HAZEKI, O. Specific role for p85/p110 β in GTP-binding-protein-mediated activation of AKT. **Biochem. J.** 392 (3): 607–614, 2005.

KUO, G.H.; PROUTY, C.; MURRAY, W. V.; et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyridine-phenylpiperazines: a novel series of potent and selective alpha1a-adrenergic receptor antagonist. **Bioorg. Med. Chem.** 8: 2263–2275, 2000.

KUNG, H.F.; STEVENSON, D.A.; ZHUANG, Z.P.; et al. New 5-HT1A receptor antagonist: [3H]p-MPPF. **Synapse** 23: 344–346, 1996.

KYPRIANOU, N. Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance. **J. Urol.** 169 (4): 1520–1525, 2003.

KYPRIANOU, N.; VAUGHAN, T. B.; MICHEL, M. C. Apoptosis induction by doxazosin and other quinazoline alpha1-adrenoceptor antagonists: a new mechanism for cancer treatment? **Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.** 380 (6): 473–477, 2009.

LAHTI, R.A.; FIGUR, L.M.; PIERCEY, M.F.; et al. Intrinsic activity determinations at the dopamine D2 guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor: utilization of receptor state binding affinities. **Mol. Pharmacol.** 42: 432–438, 1992.

LEFÈVERE-BORG, F.; O'CONNOR, S.E.; SHOEMAKER, H., et.al. Alfuzosin, a selective alpha 1-adrenoceptor antagonist in the lower urinary tract. **Br. J. Pharmacol.** 109:1282–1289, 1993.

LEE, C.H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** 40: 565–575, 2011.

LEONARDI, A.; HIEBLE, J.P.; GUARNERI, L.; et al. Pharmacological Characterization of the Uroselective Alpha -1 Antagonist Rec 15 / 2739 (SB 216469): Role of the Alpha -1L Adrenoceptor in Tissue Selectivity , Part I. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 281 (3): 1272–1283, 1997.

LEPOR, H. Role of alpha adrenergic blockers in the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Prostate** 66: 75–84. 1990.

LEPOR, H.; WILLIFORD, W.O.; BARRY, M.J.; et al. 1996. The efficacy of terazosin, finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study Group. **N. Engl. J. Med.** 335: 533–539.

LEPOR, H. Pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Rev. Urol.** 6 Suppl 9: S3–S10, 2004.

LEPOR, H. Alpha -blocker therapy for urological disorder The Evolution of Alpha-Blockers. **Reviews Urol.** 8 (4): S3–S9, 2006.

LEPOR, H. Alpha blockers for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Rev. Urol.** 9: 181–190. 2007.

LEPOR, H.; HILL, L.A. SILODOSIN for the treatment of benign prostatic hyperplasia: pharmacology and cardiovascular tolerability. **Pharmacotherapy** 30: 1303–1312, 2010.

Lepor, H.; Kazzazi, A.; Djavan, B. α -Blockers for benign prostatic hyperplasia: the new era. **Curr. Opin. Urol.** 22: 7–15, 2012.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 23: 3–25, 1997.

LIPINSKI, C. A; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 46 (1-3): 3–26, 2001.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ÁLAMO, C. Neurobiological background for the development of new drugs in schizophrenia. **Clin. Neuropharmacol.** 34: 111–126, 2011.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.L.; AYALA, D.; BENHAMÚ, B.; et al. Arylpiperazine derivatives acting at 5-HT(1A) receptors. **Curr. Med. Chem.** 9 (4): 443–469, 2002.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.L.; AYALA, D.; VISO, A.; et al. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. Part 7: Study of the influence of lipophilic factors at the terminal amide fragment on 5-HT(1A) affinity/selectivity. **Bioorg. Med. Chem.** 12: 1551–1557, 2004.

LORKE, D. A new approach to practical acute toxicity testing. **Arch. Toxicol.** 54: 275–287, 1983.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265–275, 1951.

LUTHIN, G.R.; WOLFE, B.B. [³H]Pirenzepine and [³H]quinuclidinyl benzilate binding to brain muscarinic cholinergic receptors. Differences in measured receptor density are not explained by differences in receptor isomerization. **Mol. Pharmacol.** 26: 164–169, 1984.

MALLOY B.J.; PRICE D.T.; PRICE R.R.; et al. Alpha1-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. **J. Urol.** 160: 937–943, 1998.

MANETTI, F.; CORELLI, F.; STRAPPAGHETTI, G.; BOTTA, M. Arylpiperazines with affinity toward alpha(1)-adrenergic receptors. **Curr. Med. Chem.** 9 (13): 1303–1321, 2002.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R.; Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev. Biol.** 253: 165–174, 2003.

MARSHALL, I.; BURT, R.P.; CHAPPLE, C.R. Noradrenaline contractions of human prostate mediated by alpha1A-(alpha1c-) adrenoceptor subtype. **Br. J. Pharmacol.** 115: 781–786, 1995.

MARUYAMA, K.; NAKAMURA, T.; YOSHIHARA, T.; Tamsulosin: assessment of affinity of ³H-prazosin bindings to two alpha1-adrenoceptor subtypes (alpha1H and alpha1L) in bovine prostate and rat heart and brain. **Gen. Pharmacol.** 31: 597–600. 1998.

MCCONNELL, J.D.; ROEHRBORN, C.G.; BAUTISTA, O.M.; et al. The long-term effects of doxazosin, finasteride and the combination on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. **N. Engl. J. Med.** 349: 2387–2398, 2003.

MCNEAL, J.E., The prostate gland: morphology and pathobiology. **Monographs in Urol.** 4, 3–33, 1983.

MCVARY, K.T.; ROEHRBORN, C.G.; AVINS, A.L.; et.al. Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. **J. Urol.** 185: 1793–1803, 2011.

MCNEAL, J. (1990). Pathology of benign prostatic hyperplasia: insight into etiology. **Urol. Clin. North Am.** 17: 477–486.

MENZIANI, M.C., MONTORSI, M., DE BENEDETTI, P.G., KARELSON, M. Relevance of theoretical molecular descriptors in quantitative structure-activity relationship analysis of alpha1-adrenergic receptor antagonists. **Bioorg. Med. Chem.** 7 (11): 2437–2451, 1999.

MICHEL, M.C. The Forefront for Novel Therapeutic Agents Based on the Pathophysiology of Lower Urinary Tract Dysfunction: α -Blockers in the Treatment of Male Voiding Dysfunction — How Do They Work and Why Do They Differ in Tolerability? **J. Pharmacol. Sci.** 112: 151–157, 2010.

MICHEL, M.C.; VRYDAG, W. Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. **Br. J. Pharmacol.** 147 Suppl : S88–119. 2006.

MICHELOTTI, G.A.; PRICE, D.T.; SCHWINN, D.A. Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. **Pharmacol. Ther.** 88: 281–309, 2000.

MICHELOTTI, G.A., BRINKLEY, D.M., MORRIS, D.P., et al. Epigenetic regulation of human alpha1d-adrenergic receptor gene expression: a role for DNA methylation in Sp1-dependent regulation. **FASEB J.** 21 (9): 1979–1993, 2007.

MINNEMAN, K.P. Alpha1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca²⁺?. **Pharmacol. Rev.** 40: 87–119, 1988.

MOLINA-MUÑOZ, T.; ROMERO-AVILA, M.T.; AVENDAÑO-VÁZQUEZ, S.E.; GARCÍA-SÁINZ, J.A. Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha1B-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I. **Eur. J. Pharmacol.** 578: 1–10; 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65: 55–63, 1983.

MURAMATSU, I.; KIGOSHI, S.; OSHITA, M. Two distinct alpha 1-adrenoceptor subtypes involved in noradrenaline contraction of the rabbit thoracic aorta. **Br. J. Pharmacol.** 101: 662–666, 1990.

MURAMATSU, I.; YAMANAKA, K.; KIGOSHI, S. Pharmacological profile of the novel alpha-adrenoceptor antagonist KT-611 (naftopidil). **Jpn. J. Pharmacol.** 55: 391–398, 1991.

MURAMATSU, I.; TANIGUCHI, T.; OKADA, K. Tamsulosin: α 1-adrenoceptor subtype-selectivity and comparison with terazosin. **Jpn. J. Pharmacol.** 78: 331–335, 1998.

MURATA, S.; TANIGUCHI, T.; MARAMATSU, I. Pharmacological analysis of the novel, selective alpha1-adrenoceptor antagonist, KMD-3213, and its suitability as a tritiated radioligand. **Br. J. Pharmacol.** 127 (1): 19–26, 1999.

NANDA, K.; NARUGANAHALLI, K.S.; GUPTA, S.; et al. RBx 6198: a novel alpha1-adrenoceptor antagonist for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Eur. J. Pharmacol.** 607: 213–219, 2009.

NARAYAN, P.; TEWARI, A. The United States 93-01 Study Group: a second phase III multicenter placebo controlled study of 2 doses of modified release tamsulosin in patients with symptoms of benign prostatic hyperplasia. **J. Urol.** 160:1701–1706, 1998.

NASU, K.; MORIYAMA, N.; KAWABE, K.; et al. Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. **Br. J. Pharmacol.** 119: 797–803, 1996.

NELSON, E.C.; CAMBIO, A J.; YANG, J.C.; et al. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** 10: 6–14, 2007.

NEVES, G.; MENEGATTI, R.; ANTONIO, C.B.; et al. Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. **Bioorg. Med. Chem.** 18: 1925–1935, 2010.

NICHOLSON, T.M.; RICKE, W.A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. **Differentiation** 82: 184–199, 2011.

NICKEL, J.C.; DOWNEY, J.; YOUNG, I.; BOAG, S. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. **B.J.U. Int.** 84: (9) 976–981, 1999.

NICKEL J.C. BPH: costs and treatment outcomes. **Am. J. Manag. Care** 12: S141–S148, 2006.

NILSSON, T.; LONGMORE, J.; SHAW, D.; et al. Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. **Eur. J. Pharmacol.** 372: 49–56, 1999.

NISHINO, Y.; MASUE, T.; MWA, K.; et al. Comparison of two alpha1-adrenoceptor antagonists, naftopidil and tamsulosin hydrochloride, in the treatment of lower urinary tract symptoms with benign prostatic hyperplasia: a randomized crossover study. **B.J.U. Int.** 97: 747–751, 2006.

NIZNIK, H.B.; GRIGORIADIS, D.E.; PRI-BAR, I.; et al. Dopamine D2 receptors selectively labeled by a benzamide neuroleptic: [3H]-YM-09151-2. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 329: 333–343, 1985.

NOBLE, A.J.; COULDWELL, C.; FURUKAWA, K.; et al. The effects of tamsulosin, a high affinity antagonist at functional α_1A - and α_1D - adrenoceptor subtypes. **Br. J. Pharmacol.** 120: 231–238, 1997.

NOËL, F.; POMPEU, T.E.T.; MOURA, B.C. Functional binding assays for estimation of the intrinsic efficacy of ligands at the 5-HT_{1A} receptor: Application for screening drug candidates. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods** 70 (1): 12–18. 2014.

ODAGAKI, Y.; TOYOSHIMA, R. 5-HT_{1A} receptor agonist properties of antipsychotics determined by [³⁵S]GTP γ S binding in rat hippocampal membranes. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 34: 462-466, 2007.

OELKE, M.; BACHMANN, A.; DESCAZEAUD, A.; et al. EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. **Eur. Urol.** 64: 118–140, 2013.

OLDHAM, W.M.; HAMM, H.E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 9: 60–71, 2008.

OSMAN, N.I.; MANGERA, A.; CHAPPLE, C.R. Non-Hormonal treatment of BPH/BOO. **Indian J. Urol.** 30: 194–201, 2014.

OVERINGTON, JP; AL-LAZIKANI, B; HOPKINS, AL. How many drug targets are there? **Nat. Rev. Drug Discov.** 5 (12): 993-996, 2006.

PIASCIK, M.T.; PEREZ, D.M. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 298: 403–410, 2001.

PICARELLI, Z.P.; HYPPOLITO, N.; VALLE, J.R. Synergistic effect of 5-hydroxytryptamine on the response of rats's seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 138: 354–363, 1962.

PRAJAPATI, A.; GUPTA, S.; MISTRY, B.; GUPTA, S. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. **Biomed. Res. Int.** 1–10, 2013.

PRIEST, R.; GARZOTTO, M.; KAUFMAN, J. Benign prostatic hyperplasia: a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy. **Tech. Vasc. Interv. Radiol.** 15: 261–264, 2012.

PUCADYIL, T.J.; CHATTOPADHYAY, A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. **Prog. Lipid. Res.** 45: 295–333; 2006.

PULITO, V.L.; LI, X.; VARGA, S.S.; et al. An investigation of the uroselective properties of four novel alpha(1a)-adrenergic receptor subtype-selective antagonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 294: 224–229, 2000.

QUAGLIA, W.; SANTONI, G.; PIGINI, M.; et al. Structure-activity relationships in 1,4-benzodioxan-related compounds. 8.(1) {2-[2-(4-chlorobenzyloxy)phenoxy]ethyl}-[2-(2,6-dimethoxyphenoxy)ethyl]amine (clophenphendioxan) as a tool to highlight the involvement of alpha1D- and alpha1B-adrenoreceptor subtypes in the regulation of human PC-3 prostate cancer cell apoptosis and proliferation. **J. Med. Chem.** 48 (24): 7750–7763, 2005.

RAMAGE, A.G. (2006). The role of central 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. **Br. J. Pharmacol.** 147 Suppl : S120–31.

RAYMOND, J.R.; MUKHIN, Y.V.; GETTYS, T.W.; GARNOVSKAYA, M.N. The recombinant 5-HT1A receptor: G protein coupling and signaling pathways. **Br. J. Pharmacol.** 127:1751–1764, 1999.

REES, R.W.; FOXWELL, N. A; RALPH, D.J.; et al. Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, inhibits proliferation and adrenergic contraction of prostatic smooth muscle cells. **J. Urol.** 170: 2517–2522, 2003.

RICHARDS, M.H. Rat hippocampal muscarinic autoreceptors are similar to the M2 (cardiac) subtype: comparison with hippocampal M1, atrial M2 and ileal M3 receptors. **Br. J. Pharmacol.** 99: 753–761, 1990.

RICHTAND, N.M.; WELGE, J.A.; LOGUE, A.D.; et al. Dopamine and serotonin receptor binding and antipsychotic efficacy. **Neuropsychopharmacology** 32: 1715–1726, 2007.

RICKE, W.; MACOSKA, J.; CUNHA, G. Developmental , Cellular and Molecular Biology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Differentiation** 82: 165–167, 2011.

ROKOSH, D.G.; STEWART, A.F.R.; CHANG, K.C.; et al.. Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. **J. Biol. Chem.** 271: 5839–5843, 1996.

ROTH, B.L; SHEFFLER D.J.; KROEZE, W.K.; Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. **Drug Discov.** 3: 353–359, 2004.

ROEHRBORN, C.G.. Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). **Med. Clin. North Am.** 95: 87–100.

ROEHRBORN, C.G., AND ROSEN, R.C. (2008). Medical therapy options for aging men with benign prostatic hyperplasia: focus on alfuzosin 10 mg once daily. **Clin. Interv. Aging** 3: 511–524, 2011.

ROWLEY, M.; BRISTOW, L.J.; HUTSON, P.H. Current and novel approaches to the drug treatment of schizophrenia. **J. Med. Chem.** 44 (4): 477–501, 2001.

ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W.C.; et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocr. Relat. Cancer** 11: 225–254, 2004.

RUDNER, X.L.; BERKOWITZ, D.E.; BOOTH, J.V.; et al. Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. **Circulation** 100: 2336–2343. 1999.

SCHLEIFFER, R.; PERNOT, F.; VAN OVERLOOP, B.; GAIRARD, A. In vivo involvement of endothelium-derived nitric oxide in spontaneously hypertensive rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. **J. Hypertension Suppl.** 9: S192–S193, 1991.

SCHWINN, D.A.; MICHELOTTI, G.A. Alpha1-Adrenergic receptors in the lower urinary tract and vascular bed: potential role for the alpha1D-subtype in filling symptoms and effects of aging on vascular expression. **B.J.U. Int.** 85(suppl 2): 6–11, 2000.

SIDDIQUI, E.J.; SHABBIR, M.; MIKHAILIDIS, D.P.; et al. The Role of Serotonin (5-hydroxytryptamine_{1A} and _{1B}) receptors in prostate cancer cell proliferation. **J. Urol.** 176: 1648–1653, 2006.

SIGNORETTI S.; LODA M. Defining cell lineages in the prostate epithelium. **Cell Cycle** 5: 138–141. 2006.

SILVA, C.L.; NOËL, F.; BARREIRO, E.J; Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.** 135:293–298, 2002,

SHAPIRO, E.; HARTANTO, V; AND LEPOR, H. The response to alpha blockade in benign prostatic hyperplasia is related to the percent area density of prostate smooth muscle. **Prostate** 21: 297–307, 1992.

SPEAKMAN M.J., XI CHENG. Management of the complications of BPH/BO . **Indian J. Urol.** 30 (2) : 208–213, 2014.

SOMLYO, A.P.; AND SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol. Rev.** 83: 1325–1358, 2003.

SOUZA, P.A.V.R.; PALUMBO, A.; ALVES, L.M.; et al. Effects of a nanocomposite containing *Orbignya speciosa* lipophilic extract on Benign Prostatic Hyperplasia. **J. Ethnopharmacol.** 135: 135–146, 2011.

TAKE, H.; SHIBATA, K.; AWAJI, T.; et al. Vascular α_1 -adrenoceptor subtype selectivity and α_1 -blocker-induced orthostatic hypotension. **Jpn. J. Pharmacol.** 77: 61–70, 1998.

TANNENBAUM, S.I.; PAULSON, D.F. **Effect of hormones on established prostatic hypertrophy.** In: Hinman F Jr, ed.- *Benign prostatic hypertrophy.* New York: Springer-Verlag: 256–261. 1983.

TARLE, M.; SPAJIĆ, B.; KRALJIĆ, I.V.O.; et al. Continuous Finasteride Therapy for Benign Prostate Hypertrophy Upgrades Both Neuroendocrine. **Anticancer Res.** 29: 1797–1802, 2009.

TERAI, M.; HIDAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of [3H]YM-09151-2 with [3H]spiperone and [3H]raclopride for dopamine d-2 receptor binding to rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.** 173: 177-182, 1989.

TESTA, R., GUARNERI, L., IBBA, M., et al. Characterization of alpha 1-adrenoceptor subtypes in prostate and prostatic urethra of rat, rabbit, dog and man. **Eur. J. Pharmacol.** 249: 307–315, 1993.

THIYAGARAJAN, M.; KAUL, C.L.; RAMARAO, P. Enhancement of alpha-adrenoceptor-mediated responses in prostate of testosterone-treated rat. **Eur. J. Pharmacol.** 453: 335–344, 2002.

TIMMS, B.G.; HOFKAMP, L.E. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation** 82: 173–83, 2011.

TIWARI, A.; KRISHNA, N.S.; NANDA, K.; CHUGH, A. Benign prostatic hyperplasia: an insight into current investigational medical therapies. **Expert Opin. Investig. Drugs** 14: 1359–1372. 2005.

TRUMPP-KALLMEYER, S.; HOFACK, J.; BRUINVELS, A.; HIBERT, M. Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. **J. Med. Chem.** 35 (19): 3448–3462, 1992.

UHLÉN, S.; WIKBERG, J.E. Rat spinal cord alpha 2-adrenoceptors are of the alpha 2A-subtype: comparison with alpha 2A- and alpha 2B-adrenoceptors in rat spleen, cerebral cortex and kidney using 3H-RX821002 ligand binding. **Pharmacol. Toxicol.** 69:341-350. 1991.

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; AND BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Exp. Gerontol.** 40: 121–128, 2005.

VENTURA, S.; OLIVER, V.L.; WHITE, C.W.; et al. Novel drug targets for the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Br. J. Pharmacol.** 163: 891–907, 2011.

WADHERA, P. An introduction to acinar pressures in BPH and prostate cancer. **Nat. Rev. Urol.** 10: 358–366, 2013.

WILSON, J.D.; ROEHRBORN, C. Long-term consequences of castration in men: lessons from the Skoptzy and the eunuchs of the Chinese and Ottoman courts. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 84, 4324–4331, 1999.

WU, D.; KATZ, A.; LEE, C.; AND SIMON, M.I. Activation of Phospholipase C by α -Adrenergic Receptors Is Mediated by the α subunits of Gq family. **J. Biol. Chem.** 267 (36): 25798–25802, 1992.

YAMADA, S.; ITO, Y.; TSUKADA, H. α 1-Adrenoceptors and muscarinic receptors in voiding function - binding characteristics of therapeutic agents in relation to the pharmacokinetics. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 72: 205–17, 2011.

YOO, T.K.; CHO, H.J. Benign prostatic hyperplasia: from bench to clinic. **Korean J. Urol.** 53: 139–48, 2012.

ZAICHICK, V. The prostatic urethra as a Venturi effect urine-jet pump to drain prostatic fluid. **Med. Hypotheses** 83: 65–68, 2014.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K.P. Alpha1-adrenoceptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** 375: 261–276, 1999.

Pharmacological characterization of *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-hexylpiperazine as a multi-target antagonist of α_{1A}/α_{1D} -adrenoceptors and 5-HT_{1A} receptors that blocks prostate contraction and cell growth

Fernanda Chagas-Silva · Jéssica Barbosa Nascimento-Viana · Luiz Antonio S. Romeiro · Luana C. Barberato · François Noël · Claudia Lucia Martins Silva

Received: 17 July 2013 / Accepted: 21 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a progressive disease related to the imbalance of cell growth and apoptosis, and it plays a key role in the development of lower urinary tract symptoms (LUTS). The main pharmacological treatment is based on α_{1A} -adrenoceptor blockers, but in several cases monotherapy has failed. Recent studies of prostate pathophysiology have noted the role of α_{1D} -adrenoceptors and 5-HT_{1A} receptors in prostate cell proliferation in addition to the usual role of α_{1A} -adrenoceptors in prostate contraction. *N*-phenylpiperazine is a scaffold structure that may confer drug affinity for these three receptors. Therefore, the present work aimed to investigate the pharmacological characteristics of *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-hexylpiperazine (LDT66). Using isometric contraction assays with rat prostate and aorta, LDT66 reduced phenylephrine-induced contractions and showed K_B values of 3.4 and 2.2 nM for α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors, respectively. According to the functional

binding assays data, LDT66 showed a high affinity (nanomolar range) for the 5-HT_{1A} receptors, behaving as an antagonist. LDT66 also showed a low affinity (micromolar range) for receptors unrelated to BPH such as α_{1B} -adrenoceptors, α_{2A} -adrenoceptors, muscarinic and 5-HT_{2A} receptors, which is a desirable profile in order to prevent putative side effects. Accordingly, LDT66 (100 μ g/kg) showed a marginal hypotensive effect. Using the DU-145 prostate cells, control experiments characterized the α_{1D} -adrenoceptor- and 5-HT_{1A} receptor-mediated cell growth by phenylephrine and 5-HT, respectively. LDT66 (50 nM) prevented both effects similarly. In conclusion, LDT66 is a high-affinity multi-target antagonist of relevant receptors for BPH, and it may be a new starting point for multi-target drug development to treat BPH and LUTS.

Keywords α_1 -Adrenoceptor · 5-HT_{1A} receptor · Benign prostatic hyperplasia · LDT66 · Multi-target drug · LUTS

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00210-013-0935-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Chagas-Silva · J. B. Nascimento-Viana · F. Noël · C. L. M. Silva (✉)
Laboratory of Molecular and Biochemical Pharmacology,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho,
373. room J-17, 21941-599 Cidade Universitária,
Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: cmartins@farmaco.ufrj.br

L. A. S. Romeiro · L. C. Barberato
LADETER, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01 EPCT,
71966-700 Brasília, DF, Brazil

L. A. S. Romeiro
Pharmaceutical Sciences, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília, DF, Brazil

Abbreviations

BPH Benign prostatic hyperplasia
LUTS Lower urinary tract symptoms
5-HT Serotonin
IFIS Intra-operative Floppy Iris Syndrome

Introduction

Efforts to design selective ligands for α_1 -adrenoceptor subtypes have been actively pursued because these receptors are involved in a number of diseases, including benign prostatic hyperplasia (BPH), one of the diseases responsible for lower urinary tract symptoms (LUTS) (Michel 2010; Perabo 2012).

In fact, the prostate gland is under the control of the autonomic system through the α_1 -adrenoceptors. When these receptors are hyperactive, they stimulate stromal and epithelial cell growth and smooth muscle tone, contributing to BPH and LUTS (Nasu et al. 1996; Michel and Vrydag 2006; Kim et al. 2009). α_{1A} -adrenoceptor antagonists are the most effective and widely used drugs for the symptomatic relief of BPH (Nickel 2006; Michel 2010; Perabo 2012), and they were recently confirmed by the American and European Urological Associations (McVary et al. 2011; Oelke et al. 2013) as appropriate and effective treatment alternatives for patients with moderate to severe LUTS secondary to BPH. On the other hand, non-selective α_1 -adrenoceptor antagonists, such as terazosin, have shown a similar efficacy level but have also had a higher frequency of cardiovascular adverse effects (Wilt et al. 2011). However, tamsulosin, a drug considered to be a prototype of high affinity α_{1A} -adrenoceptor antagonist, does not prevent cell proliferation and prostate growth (Anglin et al. 2002; Kojima et al. 2009). Clinical trials have shown that a large percentage of patients with BPH/LUTS responded inadequately to monotherapy with these drugs, and tamsulosin has also been more prone to induce intra-operative floppy iris syndrome (IFIS) (McVary et al. 2011; Oelke et al. 2013). BPH is a progressive disease. As a consequence, there is still a clear need to develop new drugs for LUTS/BPH (Perabo 2012), and simple selectivity for the α_{1A} -adrenoceptor does not appear to be the key for an effective clinical management (Hieble 2011; Jelski and Speakman 2012).

An alternative would be to search for multi-target drugs, a strategy that has received increasing interest in recent years because most diseases result from complex alterations of several cellular signaling pathways, so a highly selective drug may not be the most effective treatment (Roth et al. 2004; Csermely et al. 2005; Rizzo et al. 2011; Lu et al. 2012). Note that this kind of polypharmacology has gained increasing attention since the 1990s and is a hot topic in industrial drug discovery (Peters 2012). In the case of BPH, α_{1D} -adrenoceptors and 5-HT_{1A} receptors could be considered as additional targets along with the classical α_{1A} -adrenoceptors. Several studies have argued for the potential benefit of selective antagonists of both α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors for the treatment of BPH. Prostate expression of α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors increases with aging (Nasu et al. 1996) and is associated with BPH, and their downstream signaling contributes to both organ enlargement and LUTS, mainly due to urinary outflow obstruction (Michelotti et al. 2000; Kojima et al. 2006; Nishino et al. 2006; Hieble 2011). Moreover, evidence has suggested that α_{1D} -adrenoceptors also have a role in cell proliferation (García-Sáinz et al. 1999; Michelotti et al. 2000) such as the report that naftopidil, a selective α_{1D} -adrenoceptor blocker, inhibited rat prostate epithelial and stromal proliferation in vivo and was also effective in reducing stromal proliferation index in BPH patients (Kojima et al.

2009). On the other hand, a still controversial role for neuroendocrine cell-derived serotonin (5-HT) and the 5-HT_{1A} receptor has been disclosed in conditions associated with an imbalance between prostate growth and apoptosis, such as BPH and prostate cancer, as its expression is increased in prostate tissue in both BPH and prostate cancer patients (Dizeyi et al. 2004). As a consequence, the 5-HT_{1A} receptor could be considered another target for selective multi-target drugs in BPH.

After defining the molecular targets, a second important step in rational drug design is the definition of the privileged structure, scaffold that would be able to provide useful ligands for different receptors to be used as starting point (DeSimone et al. 2004). Because the *N*-phenylpiperazine moiety confers high affinity for the 5-HT_{1A} receptors and α_1 -adrenoceptors (Mokrosz et al. 1995, 1997; Saussy et al. 1996), we decided to investigate *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-hexylpiperazine (here identified as LDT66, Fig. 1), according to a previous selection among seven *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-alkylpiperazines that we had synthesized (data not published), based on its higher affinity for the 5-HT_{1A} receptor and greater selectivity towards the 5-HT_{2A} receptor. Our objective was to identify a compound that would be able to antagonize both the α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors and the 5-HT_{1A} receptors and would therefore be putatively suitable as a starting point for the development of a multi-target drug for the treatment of BPH and LUTS.

Materials and Methods

Ethics statements

The procedures were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Care from the Federal University of Rio de Janeiro (protocol: DFBC-ICB-011) and followed the recommendations of the National Council on Experimental Animal Control (SBCAL/COBEA, Brazil). Animals were kept under a light/dark cycle of 12/12 h and had free access to water and food. Male Wistar rats (250–300 g) were anesthetized with ethyl ether and killed by decapitation.

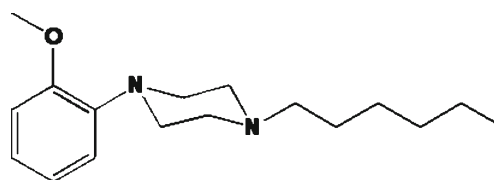


Fig. 1 Structure of *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-hexylpiperazine (LDT66) selected from seven *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-alkylpiperazines differing by the length of the aliphatic chain (LDT62–LDT68: from ethyl to octyl)

Test compound and chemicals

*N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-hexylpiperazine (LDT66, Fig. 1) was synthesized by LADETER (Catholic University of Brasilia, Brazil), as previously described for similar compounds in the same series (Romeiro et al. 2011), as its hydrochloride salt. The chemical characterization of the compound was performed using classical methods, as briefly described in the [Electronic supplementary material](#) (Fourier transform infrared spectroscopy spectra were recorded on a Perkin Elmer (Spectrum BX; USA) spectrometer; nuclear magnetic resonance (NMR) ^1H -NMR (300 and 500 MHz CDCl₃) and ^{13}C -NMR (75 and 125 MHz, CDCl₃) spectra were recorded on plus Varian (7.05 T) and Bruker Avance DRX500 and DRX300 spectrometers, and mass spectra were recorded on a liquid chromatography mass spectrometer (LCMS IT-TOF; Shimadzu Scientific Instruments, USA). The thin layer chromatography plates showed only one spot, which was corroborated by a spectrometric analysis that revealed the presence of a single compound in each sample. Stock solution (10 mM) was prepared in deionized water and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until use.

The abbreviations of the chemical names of the following drugs are as follows: 4-(2'-methoxy-)phenyl-1-[2'-(*N*-2''pyridyl)-*p*-fluorobenzamido] ethyl-piperazine (*p*-MPPF), 8-hydroxy-2-(*N,N*-dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT), 2-methoxy idazoxan (RX821002), 3-quinuclidinyl benzilate (QNB), and 8-(2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl)-8-azaspiro[4,5]decane-7,9-dione (BMY 7378).

^3H -prazosin, ^3H -ketanserin, ^3H -RX821002, ^3H -QNB, ^3H -8-OH-DPAT, ^{35}S -GTP γ S, and ^3H -*p*-MPPF were obtained from New England Nuclear/Perkin Elmer (Massachusetts, USA). Yohimbine hydrochloride and (R)-tamsulosin hydrochloride were purchased from Tocris (USA). All other chemicals were analytical grade and were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Binding assays

Native rat 5-HT receptors

Rat brains were removed and rapidly dissected on ice to obtain the hippocampus (5-HT_{1A} receptors) and the cortex (5-HT_{2A} receptors) according to a method described previously (Neves et al. 2010). The final pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and stored in liquid nitrogen. The protein content was determined according to Lowry et al. (1951). The affinity of LDT66 was evaluated with competition binding assays. For the 5-HT_{2A} receptors, 150 μg of protein were incubated with 1 nM ^3H -ketanserin, 100 nM prazosin, LDT66 (0.1–100 μM), and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) for 15 min at $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nonspecific binding was determined in the presence of 1 μM ketanserin. For the 5-

HT_{1A} receptors, 50 μg of protein were incubated with 1 nM ^3H -8-OH-DPAT, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 μM pargyline, 50 mM Tris, and LDT66 (1–300 nM) for 15 min at $37\text{ }^\circ\text{C}$. Alternatively, we used 0.5 nM ^3H -*p*-MPPF, 1 mM GTP, and 50 mM Tris-HCl (45 min, $37\text{ }^\circ\text{C}$). In both cases, nonspecific binding was determined in the presence of 10 μM 5-HT. After incubation, the samples were diluted three times with 4 ml ice-cold 5 mM Tris-HCl buffer and filtered under vacuum using glass fiber filters (GMF 3, Filtrak) pre-soaked in either 0.5 % polyethyleneimine (^3H -ketanserin and ^3H -8-OH-DPAT assays) or binding buffer (^3H -*p*-MPPF assay). Radioactivity was determined by a liquid scintillation analyzer (Packard Tri-Carb 1600 TR).

Intrinsic activity at 5-HT_{1A} receptors

The intrinsic activity of a compound at the 5-HT_{1A} receptors was estimated using both the agonist and the antagonist radioligands to define the drug affinity for the high- and low-affinity states of the receptor, respectively (Assié et al. 1999; Lahti et al. 1992). According to Assié et al. (1999), the equilibrium dissociation constant of LDT66 was calculated using either an antagonist radioligand (^3H -*p*-MPPF) in the presence of a high concentration (1 mM) of GTP (corresponding to the $K_{i\text{ Low}}$) or a radioligand agonist (^3H -8-OH-DPAT) (corresponding to the $K_{i\text{ High}}$). In these conditions, K_i ratio ($K_{i\text{ Low}}/K_{i\text{ High}}$) values considerably higher than 1.0 indicated agonism, values close to 1.0 suggested antagonism, and values lower than 1.0 indicated inverse agonism (Assié et al. 1999).

Another experimental protocol used to estimate intrinsic activity was the ^{35}S -GTP γ S binding assay. This assay was performed mainly as described by Odagaki and Toyoshima (2007) using 20 μg protein of our rat hippocampal membranes. The preparation was incubated with 0.2 nM ^{35}S -GTP γ S for 60 min at $30\text{ }^\circ\text{C}$ in a medium containing 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, and 20 μM GDP buffered with Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), in the presence or absence of 30 μM 5-HT and 10 μM LDT66. The non-specific binding was determined in the presence of 100 μM GTP γ S. The reaction was terminated by the addition of 4 ml of a cold Tris-HCl buffer (twice) followed by rapid filtration and radioactivity counting as described above.

Native rat α_{1B} -adrenoceptors

For studying the α_{1B} -adrenoceptors, rat liver membrane preparations were used according to Michel et al. (1994). Liver membrane proteins (150 μg) were incubated with 0.1 nM ^3H -prazosin, 50 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.4), and LDT66 (1–10,000 nM) for 45 min at $30\text{ }^\circ\text{C}$ (Romeiro et al. 2011). Additionally, tamsulosin (0.03–30 nM) was used for affinity comparison. After incubation, the samples were

diluted and filtered as described above. Nonspecific binding was defined in the presence of 1 μM prazosin.

Native rat α_{2A} -adrenoceptors

Membrane proteins (150 μg) from the rat cortex (Neves et al. 2010) were incubated with 1 nM [^3H]-RX821002 and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the absence and presence of LDT66 (0.1–300 μM) for 60 min at 30 °C. Nonspecific binding was determined in the presence of 100 μM L-epinephrine bitartrate. After incubation, the samples were diluted and filtered as described above. The filters were pre-soaked in 0.5 % polyethyleneimine.

Native muscarinic receptors

Membrane proteins (150 μg) from the rat cortex (Neves et al. 2010) were incubated with 0.1 nM [^3H]-QNB, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the absence and presence of LDT66 (0.1–300 μM) for 60 min at 25 °C. Atropine sulfate (10 μM) was used to determine non-specific binding.

Analysis of binding assays

Binding assays were individually assessed by nonlinear regression analyses of the untransformed data (GraphPad Prism 5.0) to estimate the compound potency (half-maximum inhibitory concentration, IC_{50}). The dissociation constants (K_i) for each receptor were calculated using the Cheng and Prusoff (1973) equation and the respective K_d values of the radioligands, as determined in the saturation experiments. The K_d value of [^3H]-prazosin was 0.52 nM for the α_{1B} -adrenoceptors. The K_d value of [^3H]-RX821002 for the α_{2A} -adrenoceptors was 2.05 nM. The K_d values of [^3H]-8-OH-DPAT (5-HT $_{1A}$ receptors; 0.8 nM) and [^3H]-ketanserin (5-HT $_{2A}$ receptors; 1.7 nM) have been previously estimated in our experimental conditions (Neves et al. 2010). The K_d value of [^3H]-*p*-MPPF (5-HT $_{1A}$ receptors) was estimated to be 0.86 nM. The K_d value of [^3H]-QNB was 0.05 nM (Luthin and Wolfe 1984). In all cases, the assay volume was 500 μL and the radioligand depletion at the end of the experiments was less than 14 %, with the exception of the assay with [^3H]-QNB (around 40 %).

Functional experiments

The thoracic aorta (α_{1D} -adrenoceptors) were removed, cleaned, and then cut into rings. The denuded rings (3 mm) were placed in an organ bath containing 9 ml of physiological solution (in mM: 122 NaCl, 5 KCl, 15 NaHCO $_3$, 11.5 glucose, 1.25 MgCl $_2$, 1.25 CaCl $_2$, and 1.25 KH $_2$ PO $_4$) bubbled with a mixture of 95 % O $_2$ /5 % CO $_2$ (37 °C). Aorta segments were subjected to an initial resting tension (20 mN) for 60 min and

were washed twice (Silva et al. 2002). Alternatively, prostate strips (10 mm; α_{1A} -adrenoceptors) were placed in a physiological solution (in mM: 138 NaCl, 5.7 KCl, 15 NaHCO $_3$, 0.36 NaH $_2$ PO $_4$, 1.8 CaCl $_2$, and 5.5 glucose) and were subjected to a pre-load of 10 mN for 60 min and washed twice (Lima et al. 2005).

Next, the rat aorta rings and prostate strips were contracted with phenylephrine (1 μM) or 60 mM KCl solution, respectively. After stabilization of the preparations, the phenylephrine-induced contraction curves were performed in the presence of 1 μM propranolol. A first cumulative phenylephrine-induced contraction curve (1–100,000 nM) was performed and the second curve was considered as a control. Then, a third curve was performed in the presence of LDT66 (10, 30, and 100 nM), 10 nM BMY 7378 (α_{1D} -adrenoceptor antagonist), or 10 nM tamsulosin (α_{1A} -adrenoceptor antagonist) incubated for 60 min. Each tissue was treated with a single concentration of the antagonists. The developed force was recorded using an isometric Grass force transducer (FT-03, Warwick, RI, USA) connected to data acquisition system (Powerlab, ADInstruments, Australia). Data were individually analyzed by nonlinear regression (GraphPad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA), and the maximal contraction obtained in each control curve (before treatment) was defined as the top. The phenylephrine concentration that produced 50 % of the maximal contraction (EC_{50}) was estimated before and after treatment with the antagonists. Next, an EC_{50} ratio (CR) was individually calculated for each drug concentration by dividing the EC_{50} value after treatment by the control value. A linear regression of the data was performed using the Schild equation [$(\log(\text{CR} - 1) = \log[\text{B}] - \log K_B)$] to calculate the slope and pA_2 value that corresponded to the antagonist affinity (Kenakin 1993). For the control drugs, tamsulosin and BMY 7378, a K_B value was calculated using a unique concentration and the Schild equation (Kenakin 1993) and compared to literature. Independent experiments were conducted before and after incubation with vehicle (physiological solution) in order to rule out a temporal effect (data not shown).

In vivo assay: blood pressure

Assays were performed as previously described (Romeiro et al. 2011). Male rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg body weight, i.p.), and body temperature was kept constant at 37 °C. After the induction of anesthesia, a tracheotomy was performed. The jugular vein and right carotid artery were cannulated with polyethylene cannulae containing heparinized saline solution (50 U/ml) for the administration of drugs or for the connection of a fluid filled pressure transducer (ADInstruments, Australia), respectively. Anesthesia was complemented with sodium pentobarbital before

the treatments. The mean arterial pressure (mmHg) was monitored continuously (PowerLab, ADInstruments, Australia). After the stabilization period (approximately 30 min), prazosin, tamsulosin, LDT66 (100 µg/kg body weight, i.v., diluted in isotonic saline), or vehicle (100 µl) were injected in bolus, and blood pressure was monitored for 10 min. Each animal was used only once. Data were expressed as a percentage of the reduction of initial blood pressure (129.1±2.9 mmHg, $n=11$), which was compatible with the basal values for this strain (Schleiffer et al. 1991).

Cell growth analysis by MTT assay and viable cell counting

Human prostate cancer cells (DU-145) obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ/UFRJ/Brazil) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % sodium pyruvate and 1 % penicillin/streptomycin, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. After reaching confluence, the cells were subcultivated by trypsinization. Subconfluent cells (74th and 75th passages) were initially cultured in FBS-free medium for 24 h, and then the medium was replaced by RPMI 1640 media supplemented with 2.5 % FBS. The cells were seeded in 96-well (5×10³ cells/well) or 24-well plates (2.5×10⁴ cells/well) for viability and cell counting, respectively. Next, the cells were treated for 48 h with vehicle (control), 1 µM 5-HT, or 3 µM phenylephrine in the absence or presence of 50 nM LDT66, BMY 7378 (α_{1D}-adrenoceptor antagonist), or *p*-MPPF (5-HT_{1A} receptor antagonist) added 30 min before the addition of the agonists. The medium supplemented with drugs was changed after 24 h. Cell viability and cell counting were determined using a functional MTT assay (Mosmann 1983) or Trypan blue (0.4 % PBS) exclusion assay, respectively. The absorbance of the formazan product was detected at 570 nm in a 96-well spectrophotometric plate reader, as described by the manufacturer. Cell counting was performed using a Neubauer chamber. The drugs were diluted daily in the RPMI without FBS and were protected from light. The values were expressed as the percentage in relation to control group, which was considered 100 %.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean and SEM of n individual experiments. The differences between two groups were determined by unpaired *t* test. Three or more groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. Differences were considered statistically significant if $P<0.05$.

Results

5-HT receptors

LDT66 inhibited the specific binding of the radioligand agonist [³H]-8-OH-DPAT to the rat 5-HT_{1A} receptors in the low nanomolar range, with a K_i value of 5.91 nM ($pK_i=8.23±0.15$, $n=4$ experiments performed in triplicate). The affinity of LDT66 for the 5-HT_{2A} receptors was much lower, with a K_i value in the micromolar range ($pK_i=5.75±0.17$, $n=3$ experiments performed in triplicate; $P<0.001$), indicating that this compound was approximately 300-fold more selective for the 5-HT_{1A} receptors than for the 5-HT_{2A} receptors. As the efficacy of a drug is as important as its affinity for therapeutic purposes, we used a functional binding approach to estimate the intrinsic activity of LDT66. We performed competition curves using a radioligand antagonist ([³H]-*p*-MPPF in the presence of a high concentration of GTP) to calculate the K_i value for the low-affinity state of the receptor. The K_i ratio for the low and high affinity states of the receptor, labeled by [³H]-*p*-MPPF and [³H]-8-OH-DPAT, respectively, is an estimate of the intrinsic activity because a value significantly higher than one indicates agonism (Assié et al. 1999), as observed for the full agonist 5-HT (Table 1). With LDT66, the K_i ratio value was not different from 1.0 (Table 1), suggesting that this compound was a 5-HT_{1A} receptor antagonist. This condition was supported by the data obtained in a [³⁵S]-GTPγS binding assay, considered as a more direct approach. Indeed, whereas 30 µM 5-HT stimulated the basal binding of [³⁵S]-GTPγS by 86.3±6.5 % ($P<0.01$), 10 µM LDT66 was without effect (8.4±2.7 % stimulation; $P>0.05$, one experiment in quadruplicate).

α_{1A}- and α_{1D}-adrenoceptors

To estimate the affinity and intrinsic activity of LDT66 for the other two target receptors (α_{1A}- and α_{1D}-adrenoceptors), we used a classical functional assay designed for the study of competitive antagonists. Data obtained with prostate strips, a tissue enriched in α_{1A}-adrenoceptors, showed that LDT66 alone did not contract the tissue but it shifted the

Table 1 Estimation of the intrinsic activity of LDT66 at native rat 5-HT_{1A} receptors

Compound	$pK_{i\text{ Low}}±\text{SEM}$	$pK_{i\text{ High}}±\text{SEM}$	$K_{i\text{ Low}}/K_{i\text{ High}}$ [95 % C.I.]
LDT66	7.99±0.05	8.23±0.15	1.71 [0.32–9.20]
5-HT	6.67±0.06	8.52±0.02	76.80 [40.50–146]

K_i values were calculated from IC₅₀ values estimated in three to six competition experiments with the agonist radioligand [³H]-8-OH-DPAT ($K_{i\text{ High}}$), or the antagonist radioligand [³H]-*p*-MPPF in the presence of 1 mM GTP ($K_{i\text{ Low}}$), in membrane preparations of rat hippocampus. 5-HT was used as a positive control for the full agonist

phenylephrine concentration-effect curve to the right. The Schild regression analysis revealed a slope not different from the unit (0.84 ± 0.22), suggesting a competitive antagonism, and a pA_2 value of 8.47 indicated that LDT66 is a high affinity antagonist of the rat prostate α_{1A} -adrenoceptors (Fig. 2A, Table 2). The affinity estimate of tamsulosin using the Schild equation (Table 2) was compatible with data from the literature (Noble et al. 1997; Kuo et al. 2000).

To study the effect of LDT66 on the α_{1D} -adrenoceptors, we used rat thoracic aorta. In this model, BMY 7378 and tamsulosin showed K_B values (Table 2) compatible with the literature (Kenny et al. 1995; Goetz et al. 1995). As observed with the prostate strips, LDT66 produced a surmountable concentration-dependent rightward shift of the phenylephrine concentration-response curve, with no change of the maximal effect (Fig. 2B). The Schild regression analysis (Fig. 2B, insert) revealed a slope not different from the unit (0.80 ± 0.13), suggesting a competitive antagonism. The pA_2 value of 8.66 indicated that LDT66 was a high affinity antagonist of the rat aorta α_{1D} -adrenoceptors (Table 2).

Off-target receptors

To estimate the affinity of LDT66 for the three off-target receptors (α_{1B} - and α_2 -adrenoceptors and muscarinic receptors), we used competition binding assays validated by the use

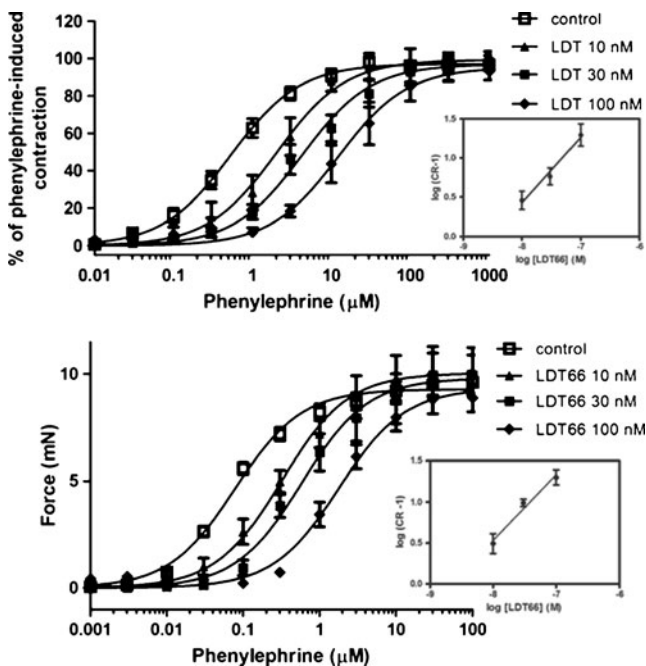


Fig. 2 Inhibition of phenylephrine-induced prostate (a) and rat aorta (b) contraction by LDT66. Tissues were contracted by increasing concentrations of phenylephrine in the absence (control, *open square*) or presence of a fixed concentration of LDT66 (10, 30, or 100 nM, *closed symbols*). Data are expressed as the mean \pm SEM of three to seven individual experiments performed with different animals and using one tissue sample for each LDT66 concentration. *Insert*: Schild plot representation

Table 2 Affinities of LDT66 for native rat α_1 -adrenoceptors

Compound	α_{1A} (Prostate) K_B (nM) $pK_B \pm$ SEM	α_{1D} (Aorta) K_B (nM) $pK_B \pm$ SEM	α_{1B} (Liver) K_i (nM) $pK_i \pm$ SEM
LDT66	3.40 ^a	2.18 ^a	221 6.66 \pm 0.18
tamsulosin	0.08 10.08 \pm 0.02	0.10 9.99 \pm 0.06	5.90 8.22 \pm 0.25
BMY 7378	–	3.03 8.52 \pm 0.06	–

^a Calculated from pA_2 values obtained by Schild regression of mean curves (See Fig. 2, insert). K_B values of tamsulosin and BMY 7378 were calculated using the Schild equation, and the EC_{50} ratio of phenylephrine-mediated contractions was measured in the absence and presence of 10 nM antagonist (see methods). K_i values were calculated from IC_{50} values estimated in competition experiments with [³H]-prazosin. pK_B and pK_i values (i.e., $-\log K$) are expressed as arithmetic means and SEM of three to five individual experiments performed in triplicate (binding assay) or with different animals (functional assay)

of at least one positive control (*data not shown*). Table 2 shows that LDT66 had a much lower affinity for the α_{1B} -adrenoceptors ($K_i = 221$ nM), exhibiting 65- to 101-fold selectivity for the α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors, respectively. We broadened our pharmacological investigation of off-target receptors by addressing LDT66's affinity for the rat α_{2A} -adrenoceptors and muscarinic receptors. LDT66 presented a relatively low affinity for the α_{2A} -adrenoceptors ($K_i = 0.81$ μ M, $n = 5$) and a still lower affinity ($K_i = 52$ μ M, $n = 3$) for the muscarinic receptors.

Effect of LDT66 on mean arterial pressure

Considering that LDT66 is an antagonist of α_1 -adrenoceptors, with higher affinity for the α_{1A} - and α_{1D} - than for the α_{1B} -adrenoceptors, we evaluated its effect in vivo using anesthetized rats. In all experiments, mean blood pressure began to decline within seconds after the injection of drugs, and the vehicle had no effect. Figure 3 shows that LDT66 (100 μ g/kg) induced a smaller hypotensive effect than did the same dose of the nonselective α_1 -adrenoceptor prazosin ($P < 0.001$), and its effect was comparable to tamsulosin.

Effect of LDT66 on the growth of prostatic cells

As LDT66 exhibited a good profile for both affinity and intrinsic activity at the target receptors (5-HT_{1A}, α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors), we then decided to investigate its effect on cell growth. For this purpose, we used the human prostate cancer DU-145 cell line (androgen-independent) that expresses α_{1D} -adrenoceptors and 5-HT_{1A} receptors, as both receptors have been related to cell proliferation in DU-145 and BPH-derived cells (Siddiqui et al. 2006; Kojima et al.

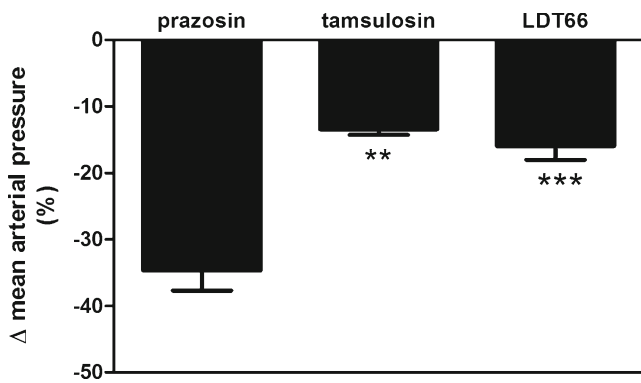


Fig. 3 Effect of LDT66 on mean arterial pressure. LDT66, prazosin and tamsulosin were administered in bolus (100 μg/kg, i.v.). Data are expressed as the mean±SEM of three to four animals for each condition. ***P*<0.01, ****P*<0.001 in relation to prazosin (one-way ANOVA followed by a post hoc Newman–Keuls test)

2009; Dizeyi et al. 2011). Figure 4 shows that 3 μM phenylephrine (a, c) and 1 μM 5-HT (b, d) increased prostate cell growth and these effects were blocked by 50 nM BMY 7378

(an α_{1D}-adrenoceptor antagonist) and *p*-MPPF (a 5-HT_{1A} receptor antagonist), respectively. LDT66 (50 nM) was also able to block the cell growth effect of phenylephrine and 5-HT (Fig. 4).

Discussion

Based on our hypothesis that an antagonist of three sub-types of receptors relevant to prostate pathophysiology, namely the 5-HT_{1A} receptors, α_{1A}- and α_{1D}-adrenoceptors, could be of value as a template for drug development targeting benign prostatic hyperplasia, the present work involved a systematic analysis of the affinity and the intrinsic activity of *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-hexylpiperazine (LDT66), as well as its effect in vivo. This compound had been partially characterized elsewhere, but the characterization was only in the scope of its structure-activity relationships (Mokrosz et al. 1995; 1997). Our work followed the general trend to re-investigate old drugs for new pharmacological properties and uses (Chong

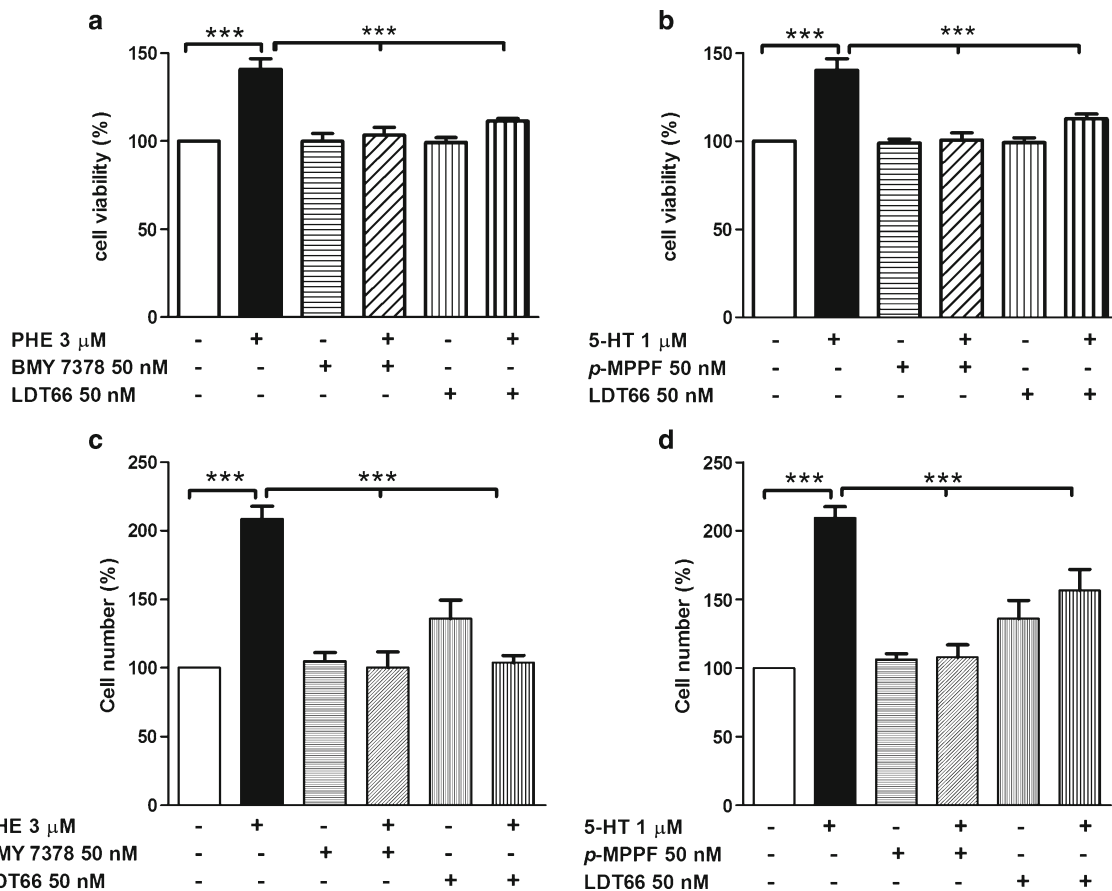


Fig. 4 Effect of LDT66 on human prostate cell line (DU-145) growth. Cell viability after treatment (48 h) was measured using functional MTT assay (a, b). Viable cell counting was performed by Trypan blue exclusion assay (c, d). Cell growth was induced by either 3 μM phenylephrine (PHE, a and c) or 1 μM 5-HT (b and d) in five (MTT) or three (Trypan

blue) independent experiments performed in quintuplicate. LDT66 or control antagonists (50 nM) were added 30 min before the agonists and were maintained for 48 h. ****P*<0.001 compared to control (no drug addition), 5-HT or PHE (one-way ANOVA followed by a post hoc Newman–Keuls test)

and Sullivan Jr 2007), and therefore, we also directly tested the effect of this compound in a model of prostate contraction and human prostate cell growth.

Here, we showed that LDT66 behaved as a high affinity antagonist of 5-HT_{1A} receptors in rat tissues and human cell line, adding new important information about this *N*-phenylpiperazine because the adequate intrinsic activity is fundamental for the therapeutic effect (in the present case, an antagonism at the 5-HT_{1A} receptor is desired). In comparison with the clinically used *N*-phenylpiperazine compound naftopidil ($K_i=108$ nM; Borbe et al. 1991), LDT66 has a higher affinity ($K_i\cong 6-10$ nM) for the 5-HT_{1A} receptors. LDT66 also exhibited a high selectivity towards the 5-HT_{1A} receptors, as expected from the data of Mokrosz et al. (1995) and the low homology existing between these 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors (Barnes and Sharp 1999). Although some authors have considered the 5-HT_{1A} receptor as an off-target (Ngo et al. 2013), 5-HT_{1A} receptor mRNA are expressed in human BPH cells, prostate cancer tissue and cell lines (Dizeyi et al. 2004). Therefore, considering that 5-HT has a fundamental role in cell proliferation as well as in tumor differentiation and gene expression (Dizeyi et al. 2004, 2011) and that the 5-HT_{1A} receptor is also involved in inflammation (Cloëz-Tayarani et al. 2004), which is highly associated with BPH and LUTS (Bostanci et al. 2013), antagonists for this type of receptor might be useful (Dizeyi et al. 2004; Siddiqui et al. 2006). Our data show that LDT66 had no cytotoxic effect on an androgen-independent cancer cell line (DU-145 cells) by its own, but it blocked the cell growth effect of 5-HT, in a qualitatively similar way as the selective 5-HT_{1A} antagonist *p*-MPPF. Note that Dizeyi et al. (2004) did not observe any effect of the antagonist of the 5-HT_{1A} receptor (WAY100135) on DU-145 cell proliferation, but they did not use this drug to challenge a 5-HT stimulus, as in our experiments, and they only looked at its effect on unstimulated cell growth. On the other hand, the other selective and more potent antagonist used by these authors (NAN-190) inhibited cell proliferation.

As the effect at the different sub-types of α_1 -adrenoceptors is important for predicting the efficacy and safety of drugs targeting BPH (see "Introduction"), we decided to measure the affinity and efficacy of LDT66 at the α_{1A} -, α_{1B} -, and α_{1D} -adrenoceptors because only a rough affinity had been described previously (Mokrosz et al. 1997) in the rat brain cortex, a preparation containing mainly a mixture of α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors (Hanft and Gross 1989; Yang et al. 1997). In a functional assay using rat aorta to evaluate α_{1D} -adrenoceptors (Testa et al. 1995), LDT66 behaved as a competitive antagonist with the K_B value in the low nanomolar range ($K_B=2.18$ nM). This value is similar to those values described for other *N*-phenylpiperazines α_{1D} -adrenoceptor antagonists, such as BMY 7378 and naftopidil (Muramatsu et al. 1991; Goetz et al. 1995; Kenny et al. 1995; Bautista et al. 2006). LDT66 was also characterized here as a potent antagonist of the α_{1A} -

adrenoceptors, in a similar functional assay using rat prostate strips ($K_B=3.4$ nM). Note that the affinities for the target receptors were within the concentration range of most drugs in clinical use (5–50 nM; Overington et al. 2006). We also showed here that LDT66 was able to block the cell growth effect of phenylephrine, a α_1 -adrenoceptor agonist, in DU-145 cells. This effect was most likely due to the blockage of the α_{1D} -adrenoceptors, contrary to a previous report for tamsulosin in these cells (Kyprianou and Benning 2000). The antigrowth effect of LDT66 seems to differ from the one reported for the α_1 -adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin, which have a quinazoline moiety and induce prostate apoptosis by a α_1 -adrenoceptor-independent way (Kyprianou and Benning 2000).

As safety has an important concern in drug development, we also performed some binding assays to estimate the affinity of LDT66 for off-target receptors with certain structural homology with the α_1 -adrenoceptor. We first reported that LDT66 has a much more reduced affinity for the off-target α_{1B} -adrenoceptor, indicating a 65- to 101-fold selectivity for $\alpha_{1A/1D}$ -adrenoceptors over this subtype responsible for hypotension when blocked at therapeutic concentrations, suggestive of a favorable safety profile. As a matter of fact, in a preliminary experiment, LDT66 (100 μ g/kg) showed only a marginal hypotensive effect, similar to tamsulosin when tested at the same dose. Exploring further the selectivity concern, we looked at the α_{2A} -adrenoceptors because these receptors (also referred to as α_{2D} -adrenoceptors in rats) are of particular interest because they are involved in regulating the central nervous, cardiovascular and male genitourinary systems, where pre-junctional receptors inhibit catecholamine release (Hein et al. 1999; Michel and Vrydag 2006). Our results showed that LDT66 had a very low affinity for these off-target receptors, suggesting a low probability of adverse effects. The very low affinity exhibited by LDT66 for muscarinic receptors also ensures the absence of atropine-like side effects.

Several clinical data suggest that the selective antagonism of prostatic α_{1A} -adrenoceptors is not enough for an effective clinical management of BPH (Hieble 2011; Jelski and Speakman 2012). Novel mechanisms underlying BPH pathophysiology are emerging and they may be useful to delineate new pharmacological approaches with increased efficacy and tolerability. In conclusion, we propose that the high affinity antagonistic properties of LDT66 at the α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors and at 5-HT_{1A} receptors, together with its anti-growth effect in human prostate cells, makes it attractive as a multi-target hit compound potentially useful in the development of new lead compounds for BPH and LUTS treatment.

Acknowledgements The authors thank Orlando R. Moreira (UFRJ, Brazil) for technical assistance and Dr. André S. Pupo (UNESP, Brazil) for information about prostate contraction assays. Claudia L. M. Silva, Luiz A. S. Romeiro, and François Noël are senior fellows of the National Council of Research (CNPq, Brazil). Financial support was provided as follows: CNPq (476394/2012-0; 473053/2004-7), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil, E-26/110.466/2012).

References

- Anglin IE, Glassman DT, Kyprianou N (2002) Induction of prostate apoptosis by α 1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5:88–95
- Assié MB, Cosi C, Koek W (1999) Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT(1A) receptors and intrinsic activity. *Eur J Pharmacol* 386:97–103
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152
- Bautista DL, Morris DH, Stein L, Asher W, Hammitt T (2006) A two model receptor system of the alpha1D adrenergic receptor to describe interactions with epinephrine and BMY7378. *J Chem Inf Model* 46:334–344
- Borbe OH, Metznerauer P, Szelenyi I (1991) 5-HT1A-agonistic properties of naftopidil, a novel antihypertensive drug. *Eur J Pharmacol* 205:105–107
- Bostanci Y, Kazzazi A, Momtahan S, Laze J, Djavan B (2013) Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. *Curr Opin Urol* 23:5–10
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–3108
- Chong CR, Sullivan DJ Jr (2007) New uses for old drugs. *Nature* 448:645–646
- Cloëz-Tayarani I, Kayyali US, Fanburg BL, Cavaillon JM (2004) 5-HT activates ERK MAP kinase in cultured-human peripheral blood mononuclear cells via 5-HT1A receptors. *Life Sci* 76:429–443
- Csermely P, Agoston V, Pongor S (2005) The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol Sci* 26:178–182
- DeSimone RW, Currie KS, Mitchell SA, Darrow JW, Pippin DA (2004) Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 7:473–494
- Dizeyi N, Bjartell A, Nilsson E, Hansson J, Gadaleanu V, Cross N, Abrahamsson PA (2004) Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *Prostate* 59:328–336
- Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzi M, Austild-Taskén K, Abrahamsson PA (2011) Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* 29:436–445
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R (1999) Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 30:449–458
- Goetz AS, King HK, Ward SD, True TA, Rimele TJ, Saussy DL Jr (1995) BMY7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 272:R5–R6
- Hanft G, Gross G (1989) Subclassification of α 1-adrenoceptor recognition sites by urapidil derivatives and other selective antagonists. *Br J Pharmacol* 97:691–700
- Hein L, Altman JD, Kobilka BK (1999) Two functionally distinct α 2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402:181–184
- Hieble JP (2011) Animal models for benign prostatic hyperplasia. *Handb Exp Pharmacol* 202:69–79
- Jelski J, Speakman M (2012) Alpha adrenoreceptor antagonists—have we reached the optimum balance of safety/efficacy? *Drug Disc Today: Ther Strategies* 9:e27–e33
- Kenakin T (1993) Competitive antagonism. In: Kenakin T (ed) *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 278–322
- Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC, Naylor AM (1995) Characterization of a α 1D-adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br J Pharmacol* 115:981–986
- Kim J, Yanagihara Y, Kikugawa T, Ji M, Tanji N, Masayoshi Y, Freeman MR (2009) A signaling network in phenylephrine-induced benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 150:3576–3583
- Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K (2006) Quantification of alpha1-adrenoceptor subtypes by real-time RT-PCR and correlation with age and prostate volume in benign prostatic hyperplasia patients. *Prostate* 66:761–767
- Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Koshimizu TA, Hayashi Y, Kiniwa M, Tsujimoto G, Kohri K (2009) Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 69:1521–1528
- Kuo GH, Prouty C, Murray WV, Pulito V, Jolliffe L, Cheung P, Varga S, Evangelisto M, Shaw C (2000) Design, synthesis and biological evaluation of pyridine-phenylpiperazines: a novel series of potent and selective alpha1a-adrenergic receptor antagonist. *Bioorg Med Chem* 8:2263–2275
- Kyprianou N, Benning CM (2000) Suppression of Human Prostate Cancer Cell Growth By alpha1-Adrenoceptor Antagonists Doxazosin and Terazosin via Induction of Apoptosis. *Cancer Res* 60:4550–4555
- Lahti RA, Figur LM, Piercey MF, Ruppel PL, Evans DL (1992) Intrinsic activity determinations at the dopamine D2 guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor: utilization of receptor state binding affinities. *Mol Pharmacol* 42:432–438
- Lima V, Mueller A, Kamikihara SY, Raymundi V, Alewood D, Lewis RJ, Chen Z, Minneman KP, Pupo AS (2005) Differential antagonism by conotoxin ρ -TIA of contractions mediated by distinct α 1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *Eur J Pharmacol* 508:183–192
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lu JJ, Pan W, Hu YJ, Wang YT (2012) Multi-target drugs: the trend of drug research and development. *PLoS One* 7:e40262
- Luthin GR, Wolfe BB (1984) [3 H]Pirenzepine and [3 H]quinuclidinyl benzilate binding to brain muscarinic cholinergic receptors. Differences in measured receptor density are not explained by differences in receptor isomerization. *Mol Pharmacol* 26:164–169
- McVary KT, Roehrborn CG, Avins AL, Barry MJ, Bruskewitz RC, Donnell RF, Foster HE Jr, Gonzalez CM, Kaplan SA, Penson DF, Ulchaker JC, Wei JT (2011) Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 185:1793–1803
- Michel MC (2010) The forefront for novel therapeutic agents based on the pathophysiology of lower urinary tract dysfunction: alpha-blockers in the treatment of male voiding dysfunction—how do they work and why do they differ in tolerability? *J Pharmacol Sci* 112:151–157
- Michel MC, Vrydag W (2006) Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147: S88–S119
- Michel MC, Hanft G, Gross G (1994) Radioligand binding studies of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br J Pharmacol* 111:533–538
- Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA (2000) Alpha1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther* 88:281–309
- Mokrosz JL, Mokrosz MJ, Charakchieva-Minol S, Paluchowska MH, Bojarski AJ, Duszyńska B (1995) Structure-activity relationship studies of CNS agents, XIX: quantitative analysis of the alkyl chain effects on the 5-HT1A and 5-HT2 receptor affinities of 4-alkyl-1arylpiperazines and their analogs. *Arch Pharm* 328:143–148
- Mokrosz MJ, Paluchowska MH, Charakchieva-Minol S, Bien A (1997) Structure-activity relationship studies of central nervous system agents, Part 32: Effect of structural modifications on alpha(1)-adrenoceptor affinity. *Arch Pharm* 330:177–180
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63

- Muramatsu I, Yamanaka K, Kigoshi S (1991) Pharmacological profile of the novel alpha-adrenoceptor antagonist KT-611 (naftopidil). *Jpn J Pharmacol* 55:391–398
- Nasu K, Moriyama N, Kawabe K, Tsujimoto G, Murai M, Tanaka T, Yano J (1996) Quantification and distribution of alpha1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. *Br J Pharmacol* 119:797–803
- Neves G, Menegatti R, Antonio CB, Graziottin LR, Vieira RO, Rates SMK, Noël F, Barreiro EJ, Fraga CM (2010) Searching for multi-target antipsychotics: discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. *Bioorg Med Chem* 18:1925–1935
- Ngo T, Nicholas TJ, Chen J, Finch AM, Griffith R (2013) 5-HT1A receptor pharmacophores to screen for off-target activity of α 1-adrenoceptor antagonists. *J Comput Aided Mol Des* 27:305–319
- Nickel JC (2006) BPH: costs and treatment outcomes. *Am J Manag Care* 12:S141–S148
- Nishino Y, Masue T, Miwa K, Takahashi Y, Ishihara S, Deguchi T (2006) Comparison of two alpha1-adrenoceptor antagonists, naftopidil and tamsulosin hydrochloride, in the treatment of lower urinary tract symptoms with benign prostatic hyperplasia: a randomized cross-over study. *BJU Int* 97:747–751
- Noble AJ, Chess-Williams R, Couldwell C, Furukawa K, Uchiyama T, Korstanje C, Chapple CR (1997) The effects of tamsulosin, a high affinity antagonist at functional alpha 1A- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* 120:231–238
- Odagaki Y, Toyoshima R (2007) 5-HT1A receptor agonist properties of antipsychotics determined by [³⁵S]GTPgammaS binding in rat hippocampal membranes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:462–466
- Oelke M, Bachmann A, Descazeaud A, Emberton M, Gravas S, Michel MC, N'dow J, Nordling J, de la Rosette JJ (2013) EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *Eur Urol* 64:118–140
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5:993–996
- Parabo FGE (2012) Drug development for LUTS—the challenge for industry. *Drug Disc Today: Ther Strategies* 9:e5–e14
- Peter J-U (2012) *Polypharmacology in Drug Discovery*. Wiley, Hoboken
- Rizzo S, Bisi A, Bartolini M, Mancini F, Belluti F, Gobbi S, Andrisano V, Rampa A (2011) Multi-target strategy to address Alzheimer's disease: design, synthesis and biological evaluation of new tacrine-based dimmers. *Eur J Med Chem* 46:4336–4343
- Romeiro LA, da Silva FM, da Silva LL, Castro HC, Miranda AL, Silva CL, Noel F, Nascimento JB, Araújo CV, Tibiriçá E, Barreiro EJ, Fraga CA (2011) Discovery of LASSBio-772, a 1,3-benzodioxole N-phenylpiperazine derivative with potent alpha 1A/D-adrenergic receptor blocking properties. *Eur J Med Chem* 46:3000–3012
- Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 3:353–359
- Saussy DL Jr, Goetz AS, Queen KL, King HK, Lutz MW, Rimele TJ (1996) Structure activity relationships of a series of Buspirone analogs at alpha-1 adrenoceptors: further evidence that rat aorta alpha-1 adrenoceptors are of the alpha-1D-subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 278:136–144
- Schleiffer R, Pernot F, Van Overloop B, Gairard A (1991) In vivo involvement of endothelium-derived nitric oxide in spontaneously hypertensive rats: effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester. *J Hypertension Suppl* 9:S192–S193
- Siddiqui EJ, Shabbir M, Mikhailidis DP, Thompson CS, Mumtaz FH (2006) The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J Urol* 176:1648–1653
- Silva CL, Noël F, Barreiro EJ (2002) Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. *Br J Pharmacol* 135:293–298
- Testa R, Destefani C, Guameri L, Poggesi E, Simonazzi I, Taddei C, Leonardi A (1995) The alpha1D-adrenoceptor subtype is involved in the noradrenaline-induced contractions of rat aorta. *Life Sci* 57:PL159–PL163
- Wilt TJ, Howe RW, Rutks I, Macdonald R (2011) WITHDRAWN: terazosin for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 9, CD003851. doi:10.1002/14651858.CD003851.pub2
- Yang M, Verfurth F, Buscher R, Michel MC (1997) Is alpha-1D adrenoceptor protein detectable in rat tissues? *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 355:438–446