

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Avaliação Farmacológica de Novos Derivados *N*-fenilpiperazínicos  
como Candidatos a Protótipo de Fármaco para o Tratamento da  
Hiperplasia Prostática Benigna

**ALINE REIS DE CARVALHO**

RIO DE JANEIRO

2015

**Avaliação Farmacológica de Novos Derivados *N*-fenilpiperazínicos como  
Candidatos a Protótipo de Fármaco para o Tratamento da Hiperplasia  
Prostática Benigna**

Dissertação de Mestrado 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 à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal)

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Lucia Martins Silva

Rio de Janeiro

2015

C398a	<p>Carvalho, Aline Reis de Avaliação farmacológica de novos derivados <i>N</i>-fenilpiperazínicos como candidatos a protótipo de fármaco para o tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna / Aline Reis de Carvalho – Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2015. xii, 75f.:il.</p> <p>Orientadora: Cláudia Lúcia Martins da Silva Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.</p> <p>Referências Bibliográficas: f. 66-75. 1. GPCR. 2. Adrenoceptor. 3. receptores 5-HT<sub>1A</sub>. 4. hiperplasia prostática benigna. 5. fenilpiperazinas. I. Silva, Claudia Lucia Martins, orient.. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título</p>
-------	---

**Aline Reis de Carvalho**

***Avaliação Farmacológica de Novos Derivados N-fenilpiperazínicos como  
Candidatos a Protótipo de Fármaco para o Tratamento da Hiperplasia  
Prostática Benigna***

Aprovada por:

---

Profa. Dra. Cláudia Lúcia Martins da Silva, ICB – UFRJ

---

Profa. Dra. Valéria do Monti Nascimento Cunha, ICB – UFRJ

---

Prof. Dr. Wilson da Costa Santos, Fac. Farmácia – UFF

---

Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro, ICB – UFRJ

---

Profa. Dra. Gilda Angela Neves, ICB – UFRJ

***Dedico este trabalho***

A todos que, de certa forma, contribuíram. Seja ouvindo,  
aconselhando, ensinando.

Aos meus pais, Alexandre e Heloisa, e à minha irmã,  
Amanda. Por me fazerem sempre encontrar a sintonia.

*“É preciso tempo para tornar-se jovem”*

(Picasso)

## AGRADECIMENTOS

À professora e minha orientadora **Dra. Cláudia Lúcia Martins da Silva**. Primeiramente por toda orientação e ensinamento. Todos foram bem aproveitamos e jamais esquecidos. Pela paciência, pelos conselhos, pelas discussões. Pelo que pude crescer. Um sincero *obrigada*.

Ao professor **Dr. François German Noel**, pelos ensinamentos e pela disposição incansável de explicar e ensinar.

Ao professor **Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas** e a todos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular. Pela companhia sempre agradável, pelos risos, pela amizade, pelo crescimento. **Tassya, Thaís, Luciana, Natasha, Miliane, Suellen, Larissa, Geraldino, Jaine, Fernando...** Obrigada!

Às amigas de projeto e da vida, **Fernanda Chagas Silva e Jessica Barbosa do Nascimento Viana**. Tiveram dias difíceis e dias felizes, soubemos aproveitar bem de ambos. Se hoje aqui escrevo, muito se deve a vocês.

À querida **Rafaela Teixeira da Silva**, pela enorme contribuição a esse trabalho.

Aos professores **Gilda Angela Neves, Valéria do Monti N. Cunha, Newton G. Castro, Wilson C. Santos**, pela avaliação e contribuições que serão feitas.

Aos amigos da faculdade, aos amigos-irmãos escoteiros, aos familiares. Sem dúvida vocês contribuíram para o que sou hoje e para o que pretendo me tornar. Jamais acomodar com o que incomoda!

Ao meu companheiro, amigo, amor, melhor ouvinte e conselheiro. **Caio Mescouto T. de Souza**, qualquer obrigada seria pouco.

Pai, mãe e florzinha, vocês foram essenciais e fundamentais. A única certeza que tenho é que sem vocês nada disso teria acontecido.

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

CARVALHO, ALINE REIS. Avaliação farmacológica de novos derivados *N*-fenilpiperazínicos como candidatos a protótipo de fármaco para o tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma doença associada à obstrução da uretra prostática e dificuldade de esvaziamento da bexiga. O tratamento da HPB envolve a utilização de antagonistas de adrenoceptores (AR)- $\alpha_{1A}$ , os quais reduzem a pressão intrauretral, porém pelo menos 25% dos pacientes não respondem a essa terapia. Receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> induzem proliferação do estroma prostático, o que os torna potenciais alvos moleculares para o tratamento dessa doença. Novos derivados *N*-fenilpiperazínicos (LDT's) foram sintetizados. LDT3, LDT5 e LDT8 foram selecionados por apresentarem antagonismo de alta afinidade (faixa nanomolar) para AR- $\alpha_{1A}$  e alta afinidade por receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Como não se conhecia a atividade intrínseca nestes receptores e considerando que a afinidade por receptores não alvos, como muscarínicos, pode desencadear efeitos adversos, o objetivo do trabalho fundamentou-se nesta avaliação farmacológica dos LDT's. Receptores acoplados a proteína G podem assumir dois estados conformacionais, mas apenas a substância agonista é capaz de diferenciar entre tais estados. Utilizando-se desse princípio, ensaios de *binding* funcional foram realizados para determinação da atividade intrínseca dos LDT's em receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Os resultados sugerem que tanto LDT3 quanto LDT5 são antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> de hipocampo de rato, enquanto LDT8 é um agonista parcial. Em ensaios de *binding* para avaliar afinidade por AR- $\alpha_{1A}$  presentes em próstata de rato, o LDT3 e LDT5 apresentaram alta afinidade ( $K_i \sim 3$  nM). Em ensaios semelhantes, LDT3 e LDT5 apresentaram baixa afinidade (faixa micromolar) para os receptores muscarínicos. Em ensaios funcionais utilizando próstata e músculo detrusor de rato, o pré-tratamento com LDT3 e LDT5 não foi capaz de bloquear o efeito do carbacol. Em conclusão, LDT3 e LDT5 são antagonistas de alta afinidade pelo AR- $\alpha_{1A}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Ambos apresentam baixa afinidade para o receptor muscarínico, o que reduz a probabilidade de efeitos adversos. LDT3 e LDT5 são considerados como potenciais candidatos a protótipos de fármaco multialvo para o tratamento dos sintomas da HPB.

## ABSTRACT

CARVALHO, ALINE REIS. Pharmacological evaluation of *N*-phenylpiperazine compounds as potential lead compounds for benign prostatic hyperplasia treatment. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is a disease associated with the obstruction of the prostatic portion of the urethra and difficulty to empty the bladder. The treatment of BPH involves the use of adrenoceptor (AR)- $\alpha_{1A}$  antagonists, which reduces the intraurethral pressure, but at least 25% of patients do not respond to this therapy. Serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors induce prostatic stromal proliferation. Therefore these receptors could be a putative pharmacological target for BPH treatment. Novel *N*-phenylpiperazine derivatives (LDT's) were synthesized. LDT3, LDT5 and LDT8 were selected because of their high affinity (nanomolar range) antagonism for AR- $\alpha_{1A}$  and high affinity for 5-HT<sub>1A</sub> receptors. However, we did not know their intrinsic activity at these receptors and considering that the affinity for non-target receptors, as muscarinic one, could cause adverse effects, the objective of this study was based on the pharmacological evaluation of LDT's at these targets. G-protein coupled receptors can assume two conformational states, but only the agonist is able to differentiate between these states. Using this principle, functional binding assays were performed using rat hippocampus membranes to determine the intrinsic activity for 5-HT<sub>1A</sub> receptors. The data suggest that LDT3 and LDT5 are antagonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, while LDT8 is a partial agonist. In binding assays to estimate the affinity for AR- $\alpha_{1A}$  using rat prostate, LDT3 and LDT5 exhibited high affinity ( $K_i \sim 3$  nM). In similar assays, LDT3 and LDT5 showed low affinity (micromolar range) for muscarinic receptors. In functional assays with rat prostate and detrusor muscle, the pre-treatment with LDT3 and LDT5 did not block the effect of carbachol. In conclusion, LDT3 and LDT5 are high affinity antagonists for AR- $\alpha_{1A}$  and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Both have low affinity for muscarinic receptors, which reduce the occurrence of adverse effects. Therefore, LDT3 and LDT5 could be considered as potential lead compounds for benign prostatic hyperplasia treatment.



## ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(N,N-dipropilamino)tetralina
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
AR	Adrenoceptor ou receptor adrenérgico
$B_{max}$	densidade dos sítios de ligação específica (receptores)
BSA	albumina sérica bovina, do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> "
CCh	carbacol
CE <sub>50</sub>	concentração do agonista necessária para obter 50% do efeito máximo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI <sub>50</sub>	concentração do agente competidor necessária para obter 50% da inibição máxima
CL	alça inter-hélice intracelular
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPM	contagem por minuto
CR	do inglês "Concentration-Ratio", razão de concentrações necessárias para obter 50% do efeito máximo
DAG	diacilglicerol
DHT	di-hidrotестosterona
$E_{max}$	efeito máximo
EL	alça inter-hélice extracelular
ERK	do inglês, "extracelular signal-regulated kinase"
$g$	Força gravitacional
GPCR	do inglês " <i>G protein-coupled receptors</i> ", receptores acoplados à proteína G
Gpp(NH)p	análogo não hidrolisável do GTP
GTP	trifosfato de guanosina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
NC-IUPHAR	do inglês " <i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification</i> ", Comitê de classificação e nomenclatura de receptores da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica
IP <sub>3</sub>	Inositol (1, 4, 5) Trifosfato

$K_B$	constante de dissociação no equilíbrio de um antagonista determinada por meio de um ensaio funcional
$K_d$	constante de dissociação no equilíbrio de um ligante determinada diretamente em um ensaio de <i>binding</i> (saturação)
$K_i$	constante de dissociação no equilíbrio de um ligante determinado em estudos de <i>binding</i> (competição)
LADETER	Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
MAP cinase	do inglês, " <i>mitogen-activated protein kinase</i> ", proteína cinase ativada por mitógeno
MLC	do inglês, " <i>myosin light chain</i> ", cadeia leve de miosina
MLCK	do inglês, " <i>myosin light chain kinase</i> ", cinase de cadeia leve de miosina
MLCP	do inglês, " <i>myosin light chain phosphatase</i> ", fosfatase de cadeia leve de miosina
NF- $\kappa$ B	fator nuclear kappa B
NA	noradrenalina
NE	neuroendócrina
PIP <sub>2</sub>	fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato
PKC	proteína cinase C
PLC	fosfolipase C
<i>p</i> -MPPF	4-(2'-methoxy-)-fenil-1-[2'-(N-2"piridil)- <i>p</i> -fluorobenzamida] etil-piperazina
POPOP	1,4-Bis(5-feniloxazol-2-il)benzeno
PPO	2,5-Difeniloxazol
PZS	prazosina
QNB	3-quinuclidinil benzilato
RNA <sub>m</sub>	do inglês " <i>Messenger Ribonucleic acid</i> ", Ácido ribonucleico mensageiro
STUI	Sintomas do Trato Urinário Inferior
TM	transmembranar
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## SUMÁRIO

Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
Abreviaturas .....	ix
<b>I. Introdução</b> .....	1
I.1 Receptores farmacológicos e desenvolvimento de fármacos .....	2
I.1.2 Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) .....	2
I.1.2.1 Classificação dos GPCRs .....	4
I.1.2.2 Vias de sinalização .....	5
I.1.2.3 Receptores adrenérgicos .....	6
I.1.2.3.1 Receptores adrenérgicos prostáticos .....	8
I.1.2.4 Receptores serotoninérgicos .....	9
I.1.2.5 Receptores muscarínicos .....	11
I.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) .....	12
I.2.1 Tratamento farmacológico atual da HPB .....	16
I.3 Avaliação farmacológica e atividade intrínseca.....	17
I.4 Novos derivados <i>N</i> -fenilpiperazínicos .....	19
<b>II. Objetivos</b> .....	21
<b>III. Material e Métodos</b> .....	23
III.1 Obtenção do LDT3, LDT5 e LDT8.....	24
III.2 Radioligantes e substâncias utilizadas .....	24
III.3 Obtenção dos órgãos .....	24
III.4 Teoria dos ensaios de radioligação ( <i>binding</i> ) e cálculo de $K_i$ .....	25
III.5 Teoria da determinação da atividade intrínseca através de <i>binding</i> funcional pelo método de razão de $K_i$ .....	26
III.6 Preparações membranares	
III.6.1 Preparação membranares para receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>1A</sub> .....	28
III.6.2 Preparação membranares para AR- $\alpha_{1A}$ .....	30
III.6.3 Preparação membranares para receptores muscarínicos M <sub>3</sub> .....	32
III.7 Dosagem de proteína .....	33
III.8 Ensaios de ligação ( <i>binding</i> )	
III.8.1 Receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>1A</sub> ( <i>binding</i> funcional) .....	34
A. Radioligante agonista [ <sup>3</sup> H]-8-OHDPAT ( $K_i$ de alta afinidade) .....	34

B. Radioligante antagonista [ <sup>3</sup> H]-pMPPF ( $K_i$ de baixa afinidade).....	35
III.8.2 Receptores adrenérgicos $\alpha_{1A}$ .....	35
III.8.3 Receptores muscarínicos $M_3$ .....	36
III.8.4 Análise dos dados e tratamento estatístico .....	36
III.9 Ensaio funcional de órgão isolado (contração isométrica) .....	37
III.9.1 Próstata .....	37
III.9.2 Bexiga .....	39
III.9.3 Análise dos dados e tratamento estatístico .....	40
<b>IV. Resultados</b> .....	<b>41</b>
IV.1 Ensaio de ligação ( <i>binding</i> ) .....	42
IV.1.1 Receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>1A</sub> ( <i>binding</i> funcional) .....	42
IV.1.2 Receptores adrenérgicos $\alpha_{1A}$ prostáticos .....	44
IV.1.3 Receptores muscarínicos $M_3$ prostáticos.....	45
IV.2 Ensaio funcionais de órgão isolado .....	48
IV.2.1 Inibição da contração induzida por carbacol em próstata de rato .....	48
IV.2.2 Inibição da contração induzida por carbacol em bexiga de rato .....	53
<b>V. Discussão</b> .....	<b>57</b>
<b>VI. Conclusões</b> .....	<b>63</b>
<b>VII. Referências bibliográficas</b> .....	<b>65</b>



## **I.1 Receptores farmacológicos e desenvolvimento de fármacos**

O conceito de receptor é fundamental nos estudos farmacológicos. Farmacologistas sabem que pequenas quantidades de certas substâncias podem acarretar em fortes efeitos nos sistemas fisiológicos, bem como alterações em suas estruturas químicas podem originar grandes diferenças de atividade. Tais fatos remetem a noção que algo na célula deve ler especificamente a informação química contida nessas substâncias e traduzir isso em efeito fisiológico. Esse “algo” foi conceitualmente referenciado como “receptor” (KENAKIN, 2009).

Os pioneiros nos estudos do que seria o conceito de receptor, John N. Langley (1852-1926) e Paul Erlich (1854-1915), seguidos por Alfred J. Clark (1885-1941), claramente perceberam a importância deste na compreensão do fenômeno biológico e anteciparam, ainda, seu potencial para o desenvolvimento de fármacos e da farmacoterapia (MAEHLE e cols., 2002).

No último século, a partir de estudos químicos e farmacológicos, além do avanço da biologia molecular e da genômica houve um grande avanço no processo de desenvolvimento de fármacos. A compreensão do processo fisiopatológico ao nível molecular e genético colaborou para a determinação de alvos moleculares ideais e específicos para a intervenção farmacológica (DREWS, 2000). Dessa forma, o planejamento racional de fármacos, que se baseia também no conhecimento da estrutura molecular do receptor, possibilita a elaboração de substâncias com perfis farmacológicos mais definidos (AMARAL e cols., 2003)

### **I.1.2 Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)**

A transdução da sinalização celular pode ser considerada como ponto crucial na interação fármaco-receptor, no qual o desencadeamento de uma cascata de reações pode ser alterado pela interação com um único alvo. Aproximadamente 850 membros formam a classe de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), a maior superfamília de receptores humanos responsáveis pela transdução do sinal da

membrana plasmática para o interior celular (TAUTERMANN, 2014; LAGERSTRÖM & SCHIÖTH, 2008).

A ativação dos GPCRs resulta em uma complexa via de sinalização que leva a uma série de respostas fisiológicas possíveis, podendo inclusive afetar a proliferação celular, diferenciação, crescimento e outras funções em órgãos do trato reprodutivo masculino (AVELLAR e cols., 2009).

A partir de estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, pode-se identificar a classe de GPCR como o mais importante alvo de fármacos no genoma humano, o que é suportado pelo fato de aproximadamente 50% dos fármacos prescritos atualmente atuarem via modulação de GPCR (GIGUERE e cols., 2014).

Em 2000, a estrutura cristalina tridimensional da rodopsina bovina, um receptor de sete domínios transmembranares, foi determinada em alta resolução, o que confirmou o arranjo transmembranar originando o que seria o núcleo do receptor (PALCZEWSKY e cols., 2000). Ademais, a sequência proteica da rodopsina revelou a presença de sete domínios alfa-hélices transmembranares (TM1 – TM7), uma extremidade N-terminal extracelular, uma extremidade C-terminal intracelular, três alças inter-hélices extracelulares (EL1- EL3) e três alças inter-hélices intracelulares (CL1 – CL3) (Fig.1).

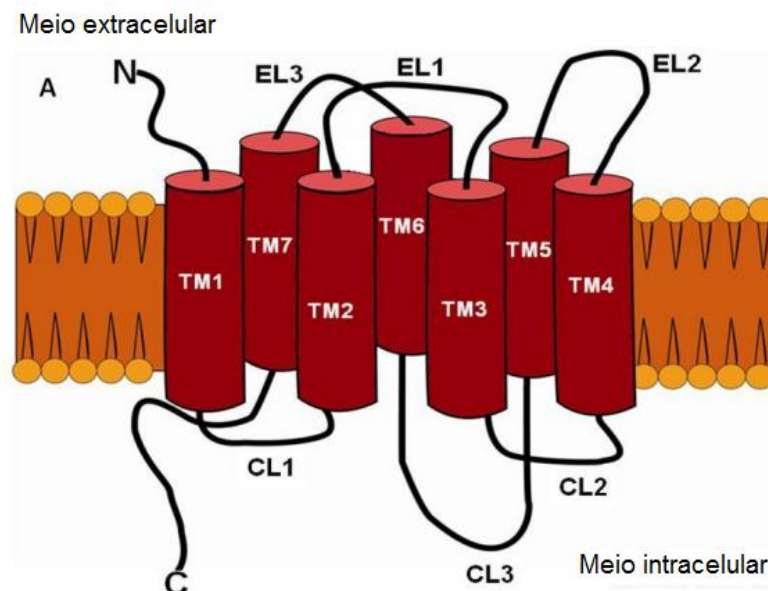


Figura 1. Representação estrutural clássica de GPCR. Adaptado de HOELZ e cols., 2013.

De forma geral, a região extracelular modula o acesso do ligante enquanto a região transmembranar hidrofóbica forma o núcleo do receptor, interagindo com

ligantes e transduzindo a informação, através de modificações conformacionais, para as regiões intracelulares, via sinalização de proteínas citosólicas (OLDHAM & HAMM, 2008; VENKATAKRISHNAN e cols., 2013; HOELZ e cols., 2013).

### **I.1.2.1 Classificação dos GPCRs**

A primeira tentativa de classificar a superfamília GPCR foi realizada em 1993 (ATTWOOD & FINDLAY, 1994), na qual os sete domínios hidrofóbicos característicos foram sequenciados e utilizados como “padrões digitais”. Dessa forma, novas sequências eram comparadas com esses padrões e então se verificava a inclusão na superfamília de GPCR.

Estudos realizados por KOLAKOWSKI (1994) apresentaram um novo sistema de classificação, o A-F. Nesse caso foram incluídos todos os receptores proteicos acoplados a proteína G, presentes em vertebrados e invertebrados, e originaram as famílias rodopsina (A), receptores de secretina (B), receptores glutamatérgicos metabotrópicos (C), receptores de acoplamento do fator de feromônio fúngico (D), receptores de AMPc (E) e receptores de opsinas de *archeobacteria* (F). Algumas dessas famílias do sistema A-F não existem em humanos, como as D, E e F. O comitê de classificação e nomenclatura de receptores da União Internacional de Farmacologia (NC-IUPHAR), utiliza tal sistema, dividindo os GPCRs em três classes principais, tendo como base suas similaridades proteicas, i.e., classes 1, 2 e 3, que equivaleriam às famílias A, B e C, respectivamente (FOORD e cols., 2005).

No ano de 2003, FREDRIKSSON e cols. (2003) realizaram uma análise filogenética que resultou na classificação de aproximadamente 800 GPCRs humanos em famílias. A partir do alinhamento entre regiões comuns dos GPCRs, árvores filogenéticas foram calculadas, resultando no GRAFS – acrônimo para o sistema que classifica cinco famílias principais denominadas: Glutamato (15 membros), Rodopsina (701), Adhesion (24), Frizzled/Taste2 (24) e Secretina (15). Tal classificação filogenética permitiu a subdivisão da família Rodopsina, a maior dentre todas, na qual se destaca o grupo  $\alpha$ , grupo de receptores de aminas biogênicas, composto pelos receptores adrenérgicos (ou adrenoceptores), receptores de serotonina (serotoninérgicos) e receptores muscarínicos, que compartilham sequências semelhantes de aminoácidos no domínio TM7. Mais especificamente, o resíduo de aspartato presente no TM3 constitui um importante



sítio de ancoramento de ligantes monoaminas básicos (LAGERSTRÖM & SCHIOTH, 2008).

### I.1.2.2 Vias de sinalização

Proteínas G heterotriméricas são proteínas ligadoras de GTP e GDP, compostas por três subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Elas realizam a comunicação entre o estímulo extracelular via ativação de GPCR e a cascata de sinalização intracelular deflagrada em resposta a este estímulo. Dessa forma, elas realizam um importante papel ao definir a especificidade e características temporais da resposta celular (OLDHAM & HAMM, 2008).

Através de técnicas de difração de raios-X, a estrutura tridimensional cristalográfica da proteína G pôde ser elucidada, permitindo a melhor compreensão das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que a compõem (WALL e cols., 1995).

A ativação de GPCRs resulta em uma alteração conformacional da proteína G que reduz afinidade por GDP, catalisando a troca por GTP na subunidade  $\alpha$ , resultando na dissociação da subunidade  $\alpha$  das subunidades  $\beta\gamma$ . Uma vez dissociadas, as subunidades  $G\alpha$ -GTP e  $G\beta\gamma$  regulam a atividade de diversos efetores enzimáticos, como adenilato ciclase, fosfolipase C, canais iônicos, que, por fim, acarretam na geração de pequenas moléculas denominadas “segundos mensageiros”. A hidrólise do GTP em GDP, na subunidade  $\alpha$  GTPásica, resulta em reassociação do heterotrímero, readquirindo seu estado inativado (LUTTRELL & LUTTRELL, 2004).

Quatro classes de proteína G já foram relatadas, baseado no grau de similaridade da sequência primária de suas subunidades  $\alpha$ :  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{q/11}$ , e  $G_{12/13}$  (WANG e cols., 2013). Dentre essas, a proteína estimulatória  $G_{\alpha_s}$  ativa a enzima adenilato ciclase e causa um aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico, AMPc, intracelular. A família  $G_{\alpha_i}$  inibe a adenilato ciclase e dispara outros eventos intracelulares. Já a família  $G_{\alpha_q}$  ativa a fosfolipase  $C_\beta$  (PLC), resultando na hidrólise intramembranar do fosfatidil inositol-4-5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) em inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). Este último, em geral em presença do íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ), ocasiona aumento da atividade da proteína cinase C (PKC), e o  $IP_3$  acarreta em liberação de  $Ca^{2+}$  de compartimentos intracelulares (retículo endo ou sarcoplasmático). O heterodímero  $\beta\gamma$ , por sua vez, está associado a uma série de

efetores e regulações, que incluem canais iônicos e fosfolipases (Fig. 2) (HAMM, 1998; JACOBY e cols., 2006).

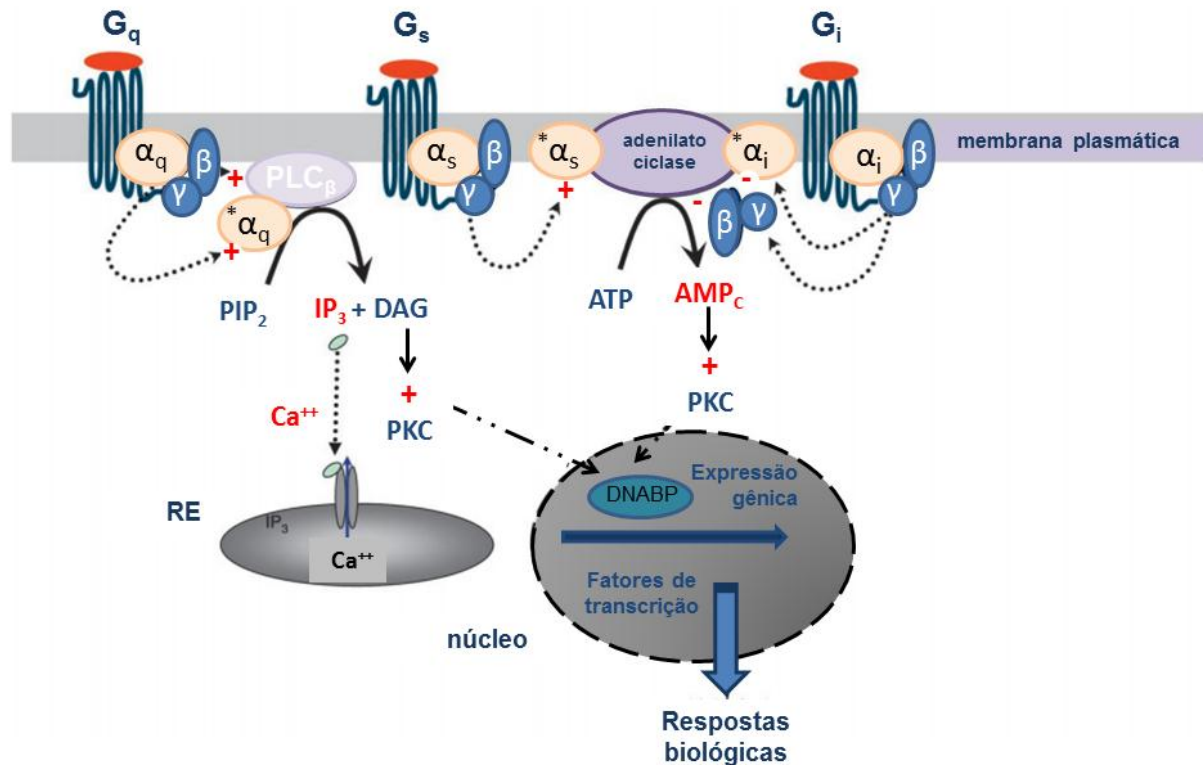


Figura 2. Sinalização clássica por GPCR através da ativação de proteína Gα<sub>q</sub>, Gα<sub>s</sub> ou Gα<sub>i</sub>. Adaptado de JACOBY e cols., 2006.

### I.1.2.3 Receptores adrenérgicos

Receptores das catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina, efetores do sistema nervoso autônomo simpático, são também conhecidos como receptores adrenérgicos ou adrenoceptores (AR) e classificados como GPCRs. São responsáveis por mediar tanto as ações centrais quanto as periféricas destas aminas (BYLUND e cols., 1994).

Os AR foram inicialmente divididos em duas classes α e β, cujas ações resultariam, principalmente, em funções excitatórias (vasoconstrição, contração da uretra, etc.) e funções inibitórias (vasodilatação, broncodilatação, etc.) (AHLQUIST, 1948). Posteriormente tais receptores foram subdivididos em α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub> e β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> e β<sub>3</sub> (DOCHERTY, 2010). Tal subdivisão tornou-se possível com a identificação, através de ensaios de radioligação (i.e. *binding*), de substâncias agonistas e antagonistas seletivas para esses subtipos de receptores (HIEBLE, 2000).

Os AR- $\alpha$  tem sido uma das famílias de receptores mais estudadas em virtude de sua importância fisiológica no controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo, digestão, micção, reprodução, dentre outros (DOCHERTY, 1998). Dentre os receptores de interesse nesse estudo, os AR- $\alpha_1$  estão amplamente distribuídos tanto no sistema nervoso central como no periférico, com destaque para musculatura lisa (HIEBLE, 2000; MICHELOTTI e cols., 2000; RUDNER e cols. 1999).

A subdivisão inicial dos AR- $\alpha_1$  resultou no AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1B}$ , com base em ensaios de radioligação em preparação de cérebro de rato. Diferentes perfis de afinidade foram estabelecidos para uma série de agonistas AR- $\alpha_1$ , como a oximetazolina, e antagonistas de AR- $\alpha_1$ , como fentolamina e WB-4101 (MORROW & CREESE, 1986). Técnicas de clonagem molecular posteriores auxiliaram na identificação de um novo subtipo, originando a classificação atual de AR- $\alpha_{1A}$ , - $\alpha_{1B}$  e - $\alpha_{1D}$  (DOCHERTY, 1998), sendo que o até então denominado como AR- $\alpha_{1C}$  foi classificado como AR- $\alpha_{1A}$ .

O mecanismo de sinalização predominante nos três subtipos de AR- $\alpha_1$  envolve o acoplamento à proteína G, mais especificamente  $G_{q/11}$ , resultando na ativação da fosfolipase  $C\beta_1$  e, dentre outras, do aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  e ativação da proteína cinase C (PKC) (HAWRYLYSHYN e cols., 2004). Ademais, a ativação de proteínas cinases via AR- $\alpha_1$  também envolve outras vias de sinalização intracelular que contribuem para regulação da proliferação celular em tecidos musculares e não musculares (MICHELOTTI e cols., 2000).

Para contração do músculo liso, após ativação de AR- $\alpha_1$  há aumento da atividade da PLC, e conseqüente aumento de DAG e  $IP_3$ , e liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares. Ademais, a PKC favorece o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular através de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L. A ligação do  $Ca^{2+}$  a calmodulina acarreta em sua modificação conformacional, permitindo, então, a ativação da cinase de cadeia leve da miosina (MLCK) pelo complexo calmodulina- $Ca^{2+}$ . A MLCK é responsável pela fosforilação de resíduo serina na cadeia leve de miosina (MLC), que, uma vez fosforilada, interage com actina resultando em contração. Após a contração, a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) desfosforila os fragmentos de MLC, acarretando em relaxamento do músculo contraído. A inibição da MLCP promove a sensibilização da maquinaria contrátil ao  $Ca^{2+}$ . Tal fenômeno envolve uma cinase específica, a Rho-cinase, que por sua vez é ativada pela RhoA via ativação GPCR (CHRIST & ANDERSSON, 2007; WHITE e cols., 2013).

O subtipo AR- $\alpha_{1A}$  está presente em alguns vasos sanguíneos, mas durante o envelhecimento outros subtipos de AR- $\alpha_1$  tem sua expressão aumentada (RUDNER e cols. 1999). Em relação ao trato urinário, este receptor é responsável por regular o tônus muscular, mediando a contração do ducto deferente humano e de rato, bem como próstata e uretra humana (CALZADA & ARTIÑANO, 2001).

Dentre os demais subtipos de AR- $\alpha_1$ , o subtipo AR- $\alpha_{1B}$  está envolvido na regulação da pressão arterial, sobretudo no idoso, quando há aumento de expressão deste subtipo de receptores (GUIMARAES & MOURA, 2001). O subtipo AR- $\alpha_{1D}$ , por sua vez, apresenta um papel importante na regulação da função da bexiga e contração do músculo detrusor. Alguns dados sugerem que durante a hiperplasia prostática benigna (HPB), e consequente obstrução ao fluxo urinário, este subtipo de receptor contribui para a hiperatividade do músculo detrusor (HAMPEL e cols., 2002). Estudos recentes sugerem ainda que a ativação desse subtipo de receptor promove estímulo proliferativo de células prostáticas (KOJIMA e cols., 2009).

#### **I.1.2.3.1 Receptores adrenérgicos prostáticos**

No âmbito da musculatura lisa prostática humana, a maior parte do RNAm e da expressão proteica de AR- $\alpha_1$  pertence ao subtipo AR- $\alpha_{1A}$ . Foi observado que em pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB) há um aumento médio do RNAm total de AR- $\alpha_1$  em cerca de seis vezes (NASU e cols., 1996). Ainda de acordo com os autores, considerando os subtipos de AR- $\alpha_1$ , a proporção de RNAm no tecido prostático normal detectada foi de 63:6:31 ( $\alpha_{1A}$ :  $\alpha_{1B}$ :  $\alpha_{1D}$ ), e na condição de HPB a quantidade de AR- $\alpha_{1D}$  aumentou em cerca de três vezes (NASU e cols., 1996). Ademais, por técnicas de autoradiografia e de hibridização *in situ* na próstata humana, o RNAm de AR- $\alpha_{1A}$  foi principalmente detectado no estroma, incluindo células do músculo liso, mas não no epitélio glandular (LEPOR e cols., 1995; WALDEN e cols., 1999). No envelhecimento nota-se aumento da expressão desses AR- $\alpha_1$ , representando, dessa forma, maior responsividade simpática pós-sináptica.

#### I.1.2.4 Receptores serotoninérgicos

Os estudos sobre a distribuição de células que se coravam com reagente para indóis originou a caracterização das células denominadas enterocromafins, por serem predominantes na mucosa gastrointestinal, as quais liberavam uma substância com propriedade vasodilatadora. A substância indólica liberada por essas células neuroendócrinas (NE) foi posteriormente isolada e caracterizada como serotonina (ou 5-hidroxitriptamina ou 5-HT) (SJOERDSMA & PALFREYMAN, 1990). A produção de 5-HT também ocorre no sistema nervoso central (SNC) e na glândula pineal, onde exerce um papel na neurotransmissão e no processo de produção do hormônio melatonina, respectivamente (BARNES & SHARP, 1999; BORJIGIN e cols., 1999; VILLALÓN & CENTURIÓN, 2007).

Estudos de GADDUM & PICARELLI (1957) apresentaram a primeira evidência da existência de mais de um tipo de receptores de 5-HT farmacologicamente distintos em íleo de cobaia, um responsável pela contração do músculo liso (receptores “D”) e outro mediando a despolarização de nervos colinérgicos (receptores “M”), que poderiam ser bloqueados por morfina e dibenzilina, respectivamente. Tais substâncias, porém, não representavam bloqueadores seletivos desses receptores, o que dificultou a classificação inicial de receptores 5-HT (BRADLEY e cols., 1986).

Posteriormente, com o desenvolvimento de técnicas de *binding*, tornou-se possível o estudo de receptores 5-HT isolados de frações membranares. Com base na diferença de ligação da [<sup>3</sup>H]-5-HT e [<sup>3</sup>H]-espiperona em receptores serotoninérgicos em preparações membranares de cérebro de rato, pôde-se classificar os receptores nas famílias 5-HT<sub>1</sub> e 5HT<sub>2</sub> (PEROUTKA & SNYDER, 1979). Porém, com a descoberta de substâncias capazes de agir seletivamente em receptores 5-HT, uma nova nomenclatura foi proposta baseada na existência de três famílias, utilizando-se de técnicas de *binding*, denominadas 5-HT<sub>1-3</sub> (PEROUTKA e cols., 1990).

Atualmente, ao considerar as estruturas primárias dos receptores e o acoplamento e afinidade dos ligantes ao receptor, são conhecidas sete famílias de receptores 5-HT (5-HT<sub>1-7</sub>) em mamíferos, totalizando 14 subtipos de receptores 5-HT

estruturalmente e farmacologicamente distintos (SAXENA, 1995; HOYER e cols., 2002; VILLALÓN & CENTURIÓN, 2007).

A maioria dos receptores 5-HT é acoplada à proteína G, ou seja, GPCR, ou também denominado receptor metabotrópico. Tais receptores pertencem principalmente à família Rodopsina (R). Apenas um membro da família de receptores de 5-HT, o 5-HT<sub>3</sub>, é um receptor ionotrópico (HUMPHREY e cols., 1993), isto é, acoplado a canal iônico (BOURNE e ZASTROW, 2010).

Com relação a sua estrutura primária, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> em particular apresentam alto grau de similaridade aos receptores adrenérgicos e dopaminérgicos (HILBERT e cols., 1991). A distribuição de cada subtipo de receptor 5-HT metabotrópico é distinta. Com relevância nesse estudo destaca-se o subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, que apresenta alta homologia na região de reconhecimento do ligante com receptores AR- $\alpha_1$  (TRUMPP-KALLMEYER e cols., 1992; OLDHAM & HAMM, 2008).

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> foi um dos primeiros da família a ter o gene clonado (KOBILKA e cols., 1987). Através de estudos de RNAm desse receptor foi possível identificar sua expressão no tecido cerebral, no qual estão presentes em alta densidade no córtex cerebral, hipocampo, septo lateral e no núcleo da rafe mesencefálica (ITO e cols., 1999; BURNET e cols., 1999; DE ALMEIDA & MENGOD, 2008). Todavia, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> também são encontrados fora do SNC, como no intestino (PUCADYIL & CHATTOPADHYAY, 2006) e próstata (ABDUL e cols., 1994; DIZEYI e cols., 2004).

A sinalização intracelular do receptor 5-HT<sub>1A</sub> envolve a proteína G<sub>i</sub>, isto é, sua ativação acarreta em inibição da enzima adenilato ciclase, com consequente diminuição dos níveis de AMPc intracelulares (HANNON e HOYER, 2008). Há o envolvimento e ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAP cinases), incluindo a via da ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), da Akt e do fator nuclear NF- $\kappa$ B (HSIUNG e cols., 2005), como também é demonstrado para AR- $\alpha_1$  (MICHELOTTI e cols., 2000). Para receptores 5-HT<sub>1A</sub> a ativação dessa via é mediada pelas subunidades  $\beta\gamma$  (heterodímero) da proteína G<sub>i</sub> (HSIUNG e cols., 2005).

Sabe-se que células NE prostáticas, uma população de células altamente especializadas, são capazes de sintetizar, armazenar e liberar fatores de crescimento, como neuropeptídeos e 5-HT (ABRAHAMSSON e cols., 1986; DI SANT'AGNESE, 1998), inclusive na próstata de pacientes com HPB

(ABRAHAMSSON e cols., 1986), havendo receptores 5-HT<sub>1A</sub> nesses tecidos (HOOSEIN e cols., 1993, SHINKA e cols., 2011). A 5-HT parece regular a interação estroma-epitélio e a patogênese da HPB (MANJURUL ISLAM e cols., 2002).

Em modelos experimentais com células tumorais de próstata, bem como com células prostáticas oriundas de pacientes com HPB, antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> foram capazes de impedir a proliferação estimulada por 5-HT, o que seria interessante no controle do crescimento de tumores independentes de androgênio (ABDUL e cols., 1994; DIZEYI e cols., 2004; NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015) bem como na lentificação da progressão da HPB.

### **I.1.2.5 Receptores muscarínicos**

Em 1914, Dale descobriu dois tipos de resposta fisiológicas a acetilcolina (ACh), uma mimetizada por muscarina e outra por nicotina, o que levou a subsequente descoberta de dois receptores de membrana colinérgicos de famílias distintas, receptor nicotínico, classificado como ionotrópico, e receptor muscarínico, um GPCR (DALE, 1914; WESS e cols., 2007).

Em mamíferos, através de técnicas de clonagem molecular, foram identificados cinco subtipos distintos de receptores muscarínicos, M<sub>1-5</sub>, que podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo a proteína G acoplada. Os subtipos M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>5</sub> são acoplados prioritariamente à proteína G<sub>q/11</sub>, enquanto os subtipos M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> ativam preferencialmente a proteína G<sub>i</sub>. Os receptores muscarínicos então amplamente distribuídos no corpo humano e medeiam diversas funções fisiológicas de acordo com sua localização e subtipo específico (CAUFIELD & BIRDSALL, 1998).

Em virtude do alto grau de similaridade na região transmembranar de reconhecimento do ligante dos receptores muscarínicos, torna-se difícil o desenvolvimento de ligantes seletivos para um único subtipo (TRUMPP-KALLMEYER e cols., 1992; HULME e cols., 1990).

O subtipo M<sub>3</sub> dos receptores muscarínicos está envolvido em funções fisiológicas importantes, incluindo contração do músculo liso e secreção glandular (KRUSE e cols., 2012). Sua ativação envolve a ativação posterior de PLC β, após

ativação da proteína  $G_{q/11}$ , com consequente aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular e ativação de MAP cinases (WEISS e cols., 2007).

No músculo detrusor humano, identificou-se a presença dos subtipos  $M_2$  e  $M_3$ , e apesar do  $M_2$  ser predominante em quantidade, representando dois terços do RNAm total, os receptores  $M_3$  são os principais responsáveis pela contração de tal músculo da bexiga e controle da micção (HEGDE e cols., 1997; CHESS-WILLIAMS e cols., 2001).

Dentre as complicações no trato urinário inferior, a obstrução ao fluxo da urina e bexiga hiperativa são comuns em homens idosos e estão frequentemente associadas com alterações na função colinérgica na bexiga. O aumento da liberação de ACh durante a fase de estocagem da urina, oriunda de fontes neuronais e não-neuronais (urotélío), pode resultar em sintomas de bexiga hiperativa, como urgência, com ou sem incontinência urinária, geralmente associada a maior frequência e noctúria (PERABO, 2012). O uso de antagonistas muscarínicos durante esta fase pode auxiliar no controle da função e alívio do sintoma, apesar de desencadarem efeitos adversos tanto ao nível periférico quanto central, incluindo boca seca, constipação, sonolência e visão turva (ANDERSSON & YOSHIDA, 2003; ANDERSSON, 2004).

No que concerne ao tecido prostático, estudos recentes em ratos demonstraram que receptores muscarínicos do subtipo  $M_3$  e  $AR-\alpha_{1A}$ , componentes da contração do músculo liso, sinalizam por uma via que converge para ativação de múltiplos mediadores de contração, como sensibilização de  $Ca^{2+}$ , através da ativação da Rho kinase, resultando na contração deste tecido (WHITE e cols., 2013). O antagonismo de receptores muscarínicos  $M_3$  neste tecido pode resultar em relaxamento prostático. Há de se destacar, porém, o risco da ocorrência os efeitos adversos oriundos da administração de um antagonista muscarínico e, principalmente, do relaxamento da bexiga em pacientes com obstrução da uretra decorrente da HPB, resultando em agravamento da retenção urinária, melhor explicitado em I.2.

## **I.2 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)**

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (Fig. 3) é altamente prevalente, podendo ser detectada em 50% dos homens acima de 50 anos de idade, sendo que



sua incidência aumenta conforme a idade (YAMADA e cols., 2011; KOJIMA e cols., 2006). Apesar da etiologia da HPB não estar claramente definida, há hiperplasia dos componentes epitelial e estromal nas zonas periuretral e de transição da glândula prostática, sendo relacionada, dentre outros fatores, com a exposição prolongada a hormônios andrógenos, com importante participação da enzima  $5\alpha$ -redutase no processo de crescimento do órgão (Mc NEAL, 1990; ROHERBORN, 2008). Tal enzima é responsável pela conversão de testosterona em di-hidrotestosterona (DHT), e percebeu-se, através de técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, que sua expressão é variável na próstata hiperplásica dentre homens com esta condição (YAMADA e cols., 2011; McCONNEL e cols., 1998). Nota-se, portanto, um estreitamento da uretra que pode acarretar em obstrução da saída da bexiga, com conseqüente fluxo lento ou intermitente, tensão e hesitação (Fig. 3)

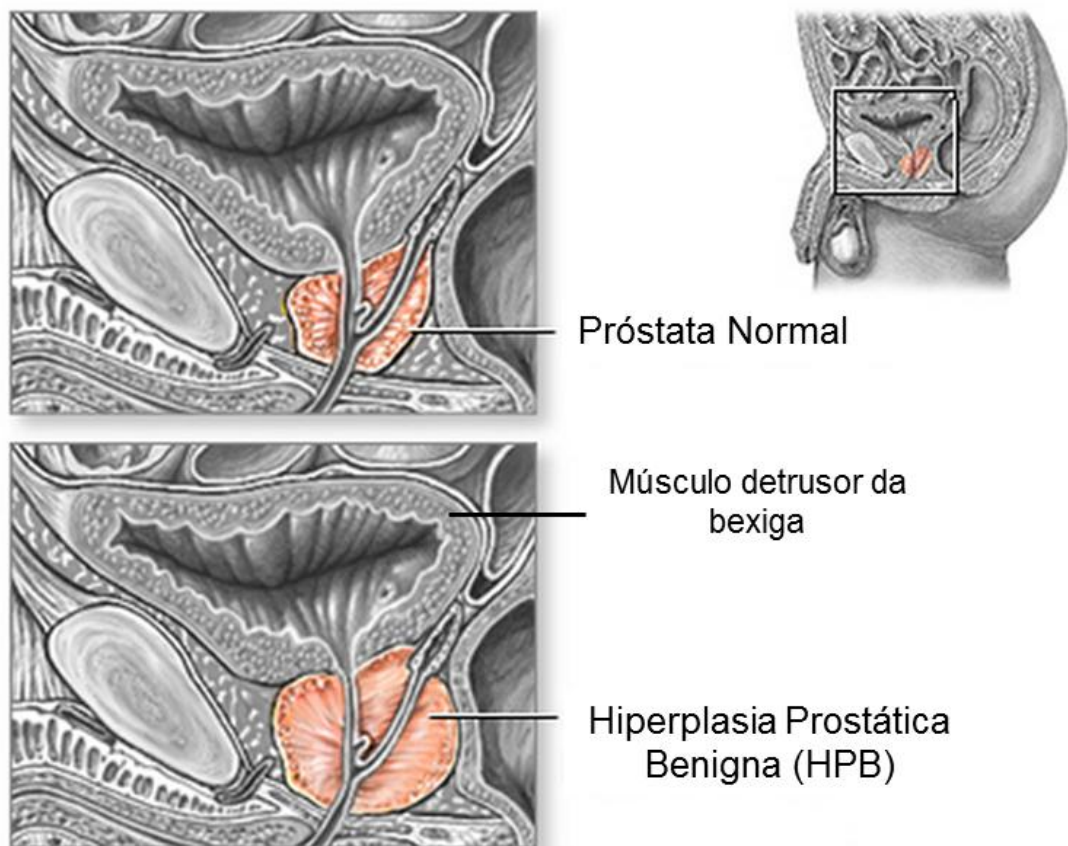


Figura 3. Representação de próstata normal e situação de hiperplasia prostática benigna (HPB). Adaptada de Medline Plus (disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/18005.htm>, acesso em 19/09/2014).

Aproximadamente metade dos homens que desenvolvem a HPB a nível histológico podem apresentar sintomas obstrutivos e irritativos e, assim, desenvolverem um quadro maior classificado como sintomas do trato urinário inferior (STUI), que apresentam um sério impacto negativo na qualidade de vida do paciente (ROEHRBORN, 2008; CHUGHTAI e cols., 2012). Algumas complicações da HPB estão associadas à retenção urinária aguda, insuficiência renal, infecção do trato urinário, hematúria, cálculo e falência renal (YAMADA e cols., 2011; PERABO, 2012).

A próstata é o único órgão interno masculino que continua a crescer após a fase adulta de uma forma altamente variável entre os homens (LOEB e cols., 2009). Alguns pesquisadores sugerem ainda que a HPB pode ser causada pela reativação de um fator de crescimento embriogênico adormecido no estroma do homem adulto. Todavia, a interação epitélio-estroma, sob influência do receptor de androgênio e DHT, é fundamental para promover a proliferação tecidual e originar nódulos hiperplásicos característico da HPB e que caracterizam o componente estático da doença (CUNHA e cols., 1983; BECHIS e cols., 2014).

A HPB apresenta dois componentes, estático e dinâmico. O primeiro componente deve-se ao processo de aumento do músculo liso prostático, com envolvimento de receptores androgênicos, de AR- $\alpha_{1D}$  e possivelmente da 5-HT de produção neuroendócrina (ABRAHAMSSON e cols., 1986; DIZEYI e cols., 2004; KOJIMA e cols., 2008). Já o componente dinâmico está diretamente associado com a contração da próstata e conseqüente estreitamento da uretra e obstrução de saída da bexiga, o qual é principalmente mediado por AR- $\alpha_{1A}$  (WHITE e cols., 2013).

Estudos recentes vêm demonstrando a relevância da atuação da 5-HT, via receptor 5-HT $_{1A}$ , e da ativação de AR- $\alpha_{1D}$  na proliferação do tecido prostático e provável relação com o desenvolvimento da HPB. A inibição do crescimento prostático em modelo murino de HPB foi observada com a administração de naftopidil, antagonista seletivo de AR- $\alpha_{1D}$ , enquanto a administração de um antagonista de AR- $\alpha_{1A}$ , tamsulosina, não foi capaz de resultar nessa inibição (KOJIMA e cols., 2008). Antagonistas de receptores 5-HT $_{1A}$ , por sua vez, apresentaram efeito anti-proliferativo, porém o estudo foi realizado com células tumorais de próstata (ABDUL e cols., 1994; DIZEYI e cols., 2004). O processo proliferativo que ocorre no tecido prostático na condição de HPB aumenta o volume da próstata, causando estreitamento da uretra, aumento da pressão intra-uretral e,

dessa forma, podendo resultar na obstrução de saída da bexiga, o que foi constatado em 48-68% dos pacientes através de estudos urodinâmicos (KIRBY e cols., 2000; CHUGHTAI e cols., 2012).

Em mamíferos, há importância da participação colinérgica, via acetilcolina (ACh) atuando através de receptores muscarínicos  $M_3$ , no processo de contração do músculo detrusor da bexiga (ABRAMS e cols., 2006; WESS e cols., 2007). Também foi descrita a participação do estímulo adrenérgico na regulação do tônus da bexiga adjacente à próstata, via noradrenalina (NA) através de  $AR-\alpha_{1A}$  (Fig. 4). Durante a estocagem da urina, percebe-se uma contração basal da uretra e da saída da bexiga a fim de manter a continência (NISHIMUNE e cols., 2012). Em pacientes com síndrome da bexiga hiperativa o tratamento usual dá-se com antagonistas muscarínicos. Contudo, não é recomendada a utilização de tais substâncias em pacientes com STUI secundária à HPB (McVARY e cols., 2011) devido ao risco de precipitar retenção urinária através do relaxamento da bexiga (CHUGHTAI e cols., 2012).

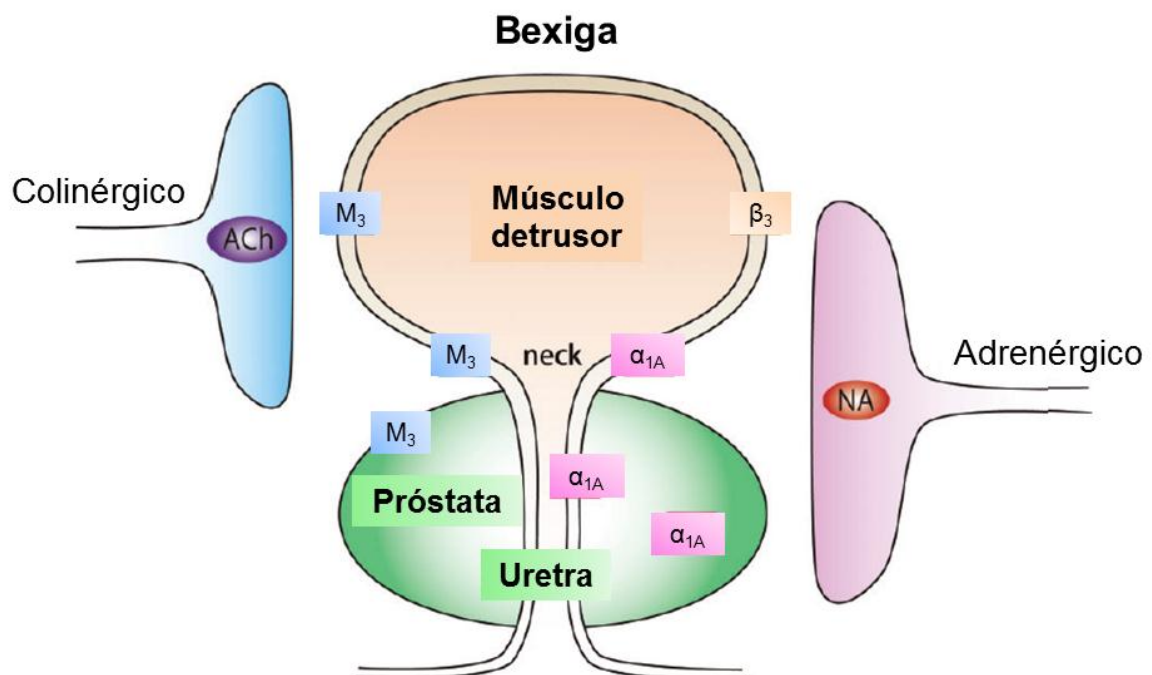


Figura 4. Inervação autonômica e receptores funcionais envolvidos no controle do tônus muscular em tecidos do trato urinário inferior. Adaptado de NISHIMUNE e cols., 2012.

Alguns estudos também mostraram a participação de receptores muscarínicos  $M_3$  na contração do músculo liso prostático (COHEN & DREY, 1988; KITAZAWA, 2013) (Fig. 4), mas sua relevância clínica como alvo no tratamento do componente dinâmico da HPB ainda não está evidente.

### I.2.1 Tratamento farmacológico atual da HPB

O tratamento farmacológico da HPB inclui a utilização de antagonistas de AR- $\alpha_1$ , dentre eles a tamsulosina, doxazosina e alfuzosina (Fig. 6), sendo tido como um tratamento efetivo e amplamente utilizado para alívio dos sintomas, e ainda como de primeira linha para pacientes que desenvolvem STUI secundária a HPB (GRECO & McVARY, 2008). Sua atuação envolve a regulação do componente dinâmico da HPB ao antagonizar os receptores adrenérgicos responsáveis pelo tônus muscular prostático e da saída da bexiga (MICHEL, 2010, PERABO, 2012). Uma segunda alternativa farmacológica envolve inibidores da 5 $\alpha$ -redutase, como finasterida e dutasterida, sendo que efeitos adversos decorrem do bloqueio androgênico crônico, como perda de libido, disfunção erétil e ejaculatória e ginecomastia (ROEHRBORN e cols., 2002). Dentre 25-30% dos pacientes não respondem a terapia atual, o que remete à necessidade de melhor compreensão dos mecanismos específicos envolvidos no desenvolvimento da doença (BECHIS e cols., 2014).

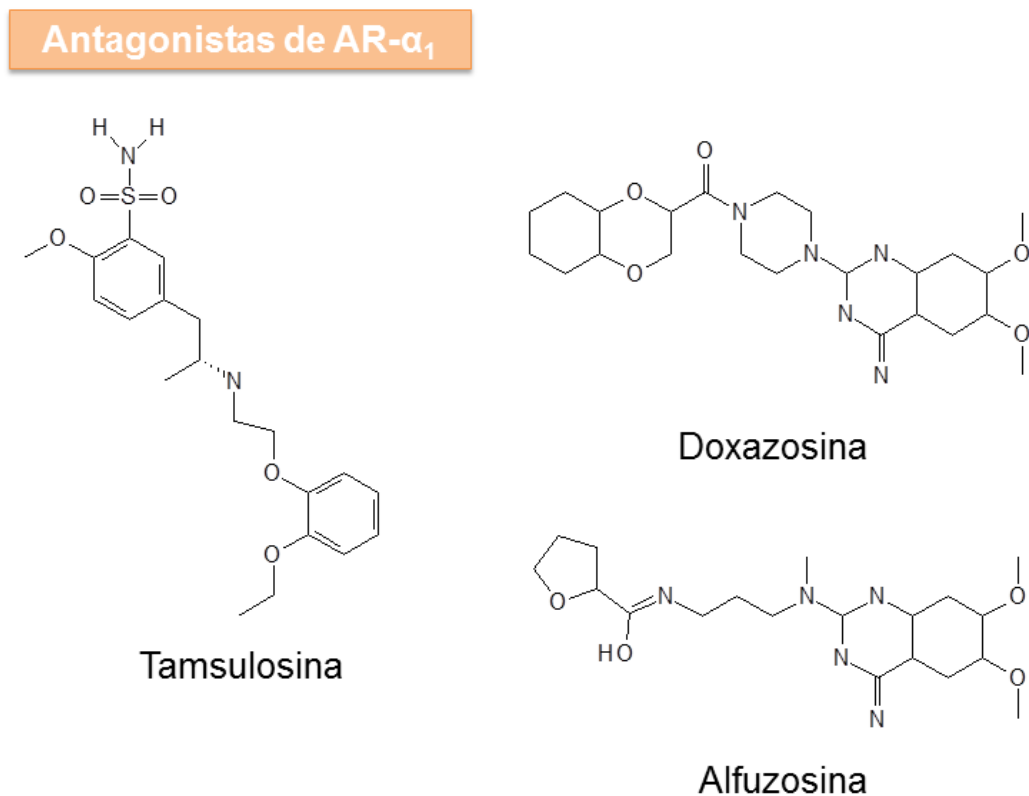


Figura 5. Fármacos atualmente utilizados no tratamento da HPB (GRECO & McVARY, 2008). Estruturas químicas retiradas de IUPHAR (disponível em: <http://www.iuphar.org/>. Acesso em 19/09/2014).

A tamsulosina é um antagonista de alta afinidade para AR- $\alpha_{1A}$  utilizado clinicamente, inclusive no Brasil, porém ela não inibe a proliferação celular e crescimento prostático (ANGLIN e cols., 2002; KOJIMA e cols., 2008). Desta forma há formulações comerciais que associam a tamsulosina a um inibidor da 5 $\alpha$ -redutase.

Sendo a HPB uma doença progressiva, há necessidade de desenvolvimento de novos fármacos, sendo que apenas a seletividade para AR- $\alpha_{1A}$  não parece ser suficiente para um efetivo tratamento clínico (JELSKI & SPEAKMAN, 2012). A falha do tratamento farmacológico remete o paciente à necessidade de procedimento cirúrgico. Uma alternativa seria o desenvolvimento de novos protótipos multi-alvos, uma estratégia que vem recebendo crescente interesse nos últimos anos principalmente pelo fato da descoberta de que diversas doenças apresentam alterações em diferentes vias de sinalização celular, o que conferiria um caráter causal multifatorial (CSERMELY e cols., 2005; RIZZO e cols., 2011; LU e cols., 2012).

### **I.3 Avaliação farmacológica e atividade intrínseca**

É importante entender conceitos como especificidade e seletividade de ligantes, sendo fármacos considerados ligantes apenas seletivos - e não específicos - por não causarem apenas um único efeito específico (BOURNE e ZASTROW, 2010). Os efeitos inespecíficos e/ou “indesejáveis” dos fármacos são denominados efeitos adversos.

O estudo da interação do fármaco com o receptor tem relevância para quantificação do efeito, uma vez que a maioria dos processos biológicos depende da habilidade de ligantes de ligarem e discriminarem seus alvos (AJAY, 1995). Na interação fármaco-receptor surge o termo *afinidade*, que traduz a capacidade do fármaco de se ligar ao sítio de interação, e ainda o termo *atividade intrínseca*, que representa a capacidade do complexo fármaco-receptor em desencadear uma determinada resposta biológica (FRAGA, 2001). Pode-se considerar como ligante de alta afinidade aquele que necessita de baixas concentrações para se ligar ao receptor.

A eficácia de um fármaco depende, de maneira simplificada, de suas propriedades químicas as quais irão influenciar o reconhecimento molecular do

ligante pelo receptor, i.e., grupos farmacofóricos, os quais definem sua afinidade e também suas propriedades farmacocinéticas. O grupamento farmacofórico é aquele presente na molécula e necessário para atividade biológica, podendo tal atividade ser modulada pela troca de átomos ou grupos funcionais (KÜMMERLE, 2005; BARREIRO, 2002).

A partir da síntese de novos candidatos a fármacos, faz-se necessária a realização da avaliação farmacológica dos mesmos a fim de determinar sua afinidade, atividade intrínseca e perfil de atividade terapêutica.

A partir do modelo do complexo ternário, entende-se que GPCRs podem assumir dois estados conformacionais: um estado inativo (R) desacoplado da proteína G e um estado ativado (R\*), formado pelo complexo entre o agonista, o receptor e a proteína G (AR\*G – complexo ternário) (NOEL e cols., 2014). A afinidade de um ligante antagonista é semelhante para ambos estados do receptor, enquanto a afinidade de um agonista é maior quando na presença do complexo ternário. Dessa forma, a diferença de afinidade de uma substância para os estados de alta e baixa afinidade do receptor pode ser usada para estimar sua atividade intrínseca ou eficácia ( $\alpha$ ). Se uma substância que possui atividade intrínseca interage com seu receptor, há produção de um estímulo cuja intensidade varia de acordo com suas propriedades. Sendo assim, agonistas totais apresentam maior atividade intrínseca ( $\alpha = 1$ ) do que agonistas parciais ( $\alpha$  entre zero e 1) e do que agonistas inversos ( $\alpha < 1$ ), e antagonistas não possuem atividade intrínseca ( $\alpha =$  zero) (LAHTI e cols., 1992).

Na presença de GTP há dissociação do complexo ternário (AR\*G), logo predomina o estado de baixa afinidade do receptor, enquanto na ausência deste nota-se a existência de ambos estados, baixa e alta afinidade (LAHTI e cols., 1992). Tanto o agonista quanto o antagonista são capazes de se ligar ao receptor, porém apenas o primeiro tem afinidade diferente para cada estado conformacional.

Experimentalmente, a determinação da atividade intrínseca de uma substância pode ser realizada em ensaios funcionais clássicos (por exemplo, ensaio de órgão isolado) ou, ainda, através de ensaio de *binding* funcional utilizando-se do método de razão de  $K_i$ . Neste caso, são utilizadas duas condições experimentais: (1) utilizando um radioligante agonista na ausência de GTP para determinar a afinidade pelo estado de alta afinidade do receptor ( $K_i$  agonista) e (2) utilizando um radioligante antagonista na presença de GTP para determinar a afinidade do ligante

pelo estado de baixa afinidade do receptor ( $K_i$  antagonista). A presença do GTP em concentrações milimolares (ou de um análogo não hidrolisável, como o Gpp(NH)p) é necessária para causar a dissociação da proteína G e provocar a conformação do estado de baixa afinidade do receptor. A razão entre tais valores de afinidade ( $K_i$  antagonista /  $K_i$  agonista) determina a atividade intrínseca da substância em estudo. Uma vez que antagonistas se ligam com a mesma afinidade aos estados de baixa e alta afinidade do receptor, espera-se encontrar valores semelhantes de  $K_i$  antagonista e  $K_i$  agonista, ou seja, um valor de razão de  $K_i$  de aproximadamente 1 (ASSIÉ e cols, 1999). Agonistas plenos apresentam razão de  $K_i$  superior a 1. No caso de agonistas inversos, entretanto, a razão de  $K_i$  seria inferior a 1, enquanto para agonistas parciais tal razão seria superior a 1, mas inferior a encontrada para agonistas plenos, em mesmo ensaio (NOEL e cols., 2014).

#### I.4 Novos derivados *N*-fenilpiperazínicos

A estrutura *N*-fenilpiperazínica (Figs. 6 e 7) confere afinidade por AR- $\alpha_1$  e, dependendo do tamanho do espaçador entre os grupamentos farmacofóricos primário e secundário e das substituições no(s) grupo(s) farmacofórico(s), é possível modular a afinidade para os subtipos de AR- $\alpha_1$ . Anteriormente nosso grupo caracterizou as propriedades farmacológicas de LASSBio 772 (Fig. 7) sintetizado pelo Dr. Luiz A. Romeiro o qual possui alta afinidade aparente por AR- $\alpha_{1D}$  (ROMEIRO e cols., 2011).

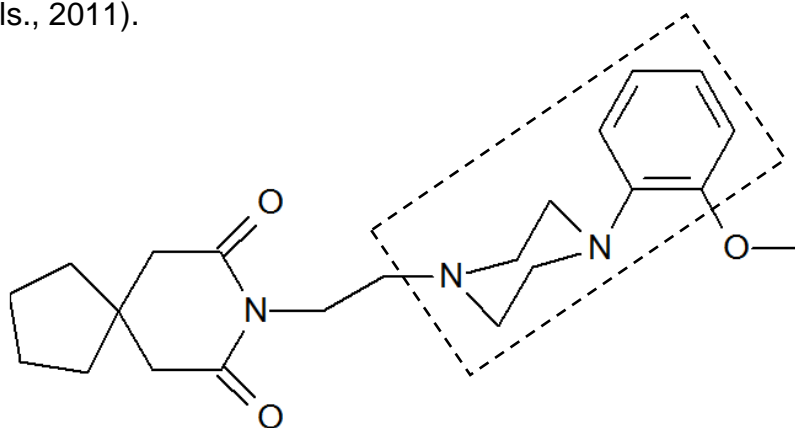


Figura 6. Estrutura química da ferramenta farmacológica BMY7378, ligante seletivo de AR- $\alpha_{1D}$ , com destaque para a porção *N*-fenilpiperazínica (IUPHAR, disponível em: <http://www.iuphar.org/>. Acesso em 19/09/2014).

Considerando a estrutura privilegiada *N*-fenilpiperazínica foram sintetizados novos derivados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) na Universidade de Brasília, também sob a coordenação do Dr. Luiz A. S. Romeiro. A série denominada LDT teve alterações nas porções radicalares  $R_1$  e  $R_2$  (Fig. 7), mas mantendo o espaçador de dois carbonos ligado ao átomo de nitrogênio na posição 4 ( $R_1$ ).

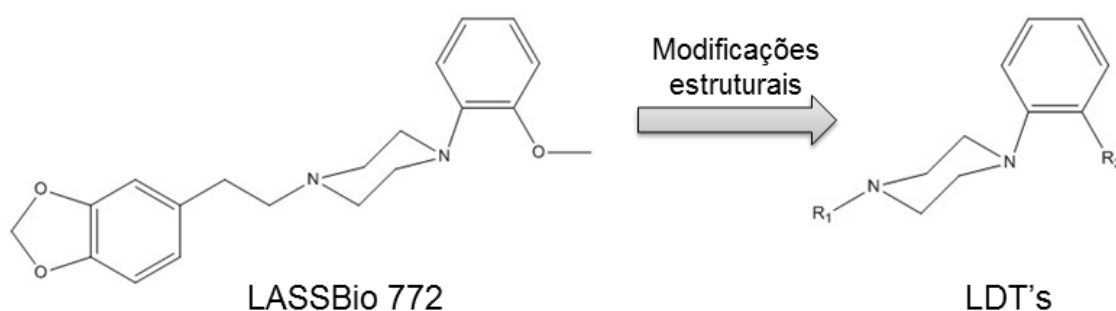


Figura 7. Estrutura genérica de novos derivados *N*-fenilpiperazínicos (LDT's) obtidos através de modificações moleculares no LASSBio 772.

LDT3, LDT5 e LDT8 tem alta afinidade (faixa nM) por  $AR-\alpha_{1A}$  e  $AR-\alpha_{1D}$  e também por receptores serotoninérgicos  $5-HT_{1A}$  de rato (NASCIMENTO, 2011). Ademais eles bloqueiam a contração induzida por fenilefrina na aorta de rato, tecido que expressa majoritariamente  $AR-\alpha_{1D}$  (NASCIMENTO, 2011; SCOFIELD e cols., 1995). O perfil farmacológico multi-alvo até então escrito para o LDT3, LDT5 e LDT8 os torna interessantes como candidatos a protótipos no tratamento da HPB (PCT/BR2013000003). Porém, novos estudos precisam ser realizados a fim de se determinar a atividade intrínseca dessas substâncias nos alvos farmacológicos, bem como a afinidade por receptores não alvos, a fim de se prever a eventual ocorrência de efeitos adversos. Neste trabalho aprofundamos a avaliação farmacológica dos LDT3, LDT5 e LDT8 em receptores  $5-HT_{1A}$ ,  $AR-\alpha_{1A}$  prostáticos e receptores muscarínicos de rato.





## **II. Objetivos**

---

Esse trabalho teve como objetivos:

- 1) Determinar a atividade intrínseca do LDT3, LDT5 e LDT8 em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>
- 2) Avaliar a afinidade do LDT3 e LDT5 em AR- $\alpha_{1A}$  e receptores muscarínicos M<sub>3</sub> prostáticos de rato
- 3) Avaliar a potência e atividade intrínseca do LDT3 e LDT5 em receptores muscarínicos M<sub>3</sub> expressos na próstata e bexiga de rato



### III. Material & Métodos

---

#### III.1 Obtenção do LDT3, LDT5 e LDT8

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos, denominados LDT3, LDT5 e LDT8, foram sintetizados pelo grupo do Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro (LADETER, Universidade Brasília) e disponibilizados na forma de monoclóridato. Alíquotas na concentração de 10 mM foram preparadas conforme necessidade, a partir de dissolução da substância em água Milli Q<sup>®</sup>, e armazenadas a -20°C para posterior utilização. Estas substâncias foram objeto de pedido de depósito de patente PCT/BR2013000003.

#### III.2 Radioligantes e substâncias utilizadas

Os radioligantes [<sup>3</sup>H](±)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamina) tetralina ([<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT, atividade específica 154,2 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-4-(2'-metoxi-)-fenil-1-[2'-(*N*-2"-piridil)-*p*-fluorobenzamida] etil-piperazina ([<sup>3</sup>H]-*p*-MPPF, 74,2 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-prazosina (85 Ci/mmol) e [<sup>3</sup>H]-3-quinuclidinil benzilato ([<sup>3</sup>H]-QNB, 48,0 Ci/mmol) foram adquiridos da New England Nuclear Life Science Products, PerkinElmer, EUA. As demais substâncias não radioativas foram obtidas de Sigma-Aldrich. As substâncias estoques foram diluídas em água, com exceção da prazosina que foi diluída em etanol absoluto.

#### III.3 Obtenção dos órgãos

Todos os protocolos foram previamente aprovados pela comissão de ética no uso de animais da UFRJ (CEUA, protocolo: DFBC-ICB011) e estão de acordo com as normas do CONCEA.

Ratos Wistar machos adultos (250-300g) foram submetidos à anestesia em câmara saturada de éter e eutanasiados por decapitação. Com a finalidade posterior de obter um homogeneizado protéico enriquecido com o receptor de interesse para a realização dos ensaios de ligação (*binding*), o cérebro e a próstata foram removidos e delicadamente dissecados em placa de gelo (NEVES e cols, 2010; LAU & PENNEFATHER, 1998). Os tecidos obtidos, hipocampo e próstata, foram

armazenados em nitrogênio líquido ( $N_2$ ) até sua efetiva utilização no preparo do homogeneizado. Para ensaios de órgão isolado (ensaios funcionais), após a eutanásia dos animais realizou-se a retirada da próstata e bexiga, seguida de dissecação, como melhor descrito em III.9.

#### III.4 Teoria dos ensaios de radioligação (*binding*) e cálculo de $K_i$

Os ensaios de *binding* consistem na interação (i.e., ligação específica) de um ligante radioativo (radioligante) com o receptor.

No ensaio de *binding* competitivo foram realizadas três condições experimentais de modo a determinar a ligação total do radioligante (i.e., ligação específica ao receptor e não-específica), a ligação não-específica do radioligante e a ligação da substância teste ao receptor (agente competidor). Para determinação da ligação não específica, utilizou-se uma substância não radioativa em concentração próxima a 1000 vezes o valor de  $K_d$  do radioligante. A ligação específica, passível de sofrer competição com a substância teste, foi definida pela diferença da ligação total e não-específica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos a partir da realização de ensaios de competição tornam possível a construção de uma curva de inibição da ligação específica do radioligante (Fig. 8), de modo que o aumento da concentração da substância competidora resulta em aumento da inibição de tal ligação específica, reduzindo a formação do complexo radioligante-receptor, o que pode ser quantificado pela redução na contagem da radioatividade (em CPM) contida nos filtros. Calculou-se a concentração da substância teste que inibiu 50% da ligação específica total ( $CI_{50}$ ), um parâmetro de potência.

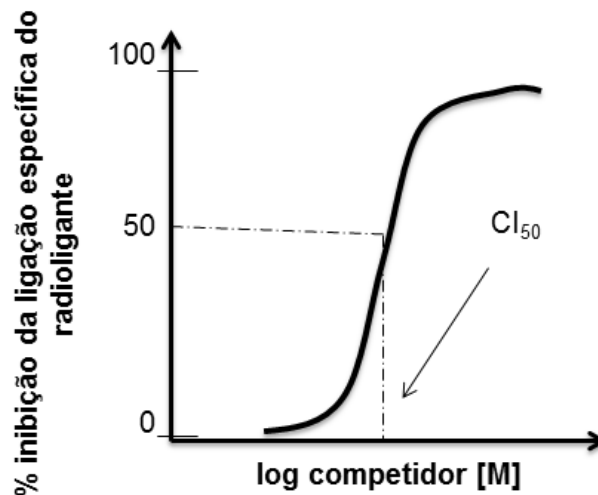


Figura 8. Curva hipotética de inibição obtida através de ensaio de *binding*, em escala logarítmica.

A equação de Cheng-Prusoff (CHENG & PRUSOFF, 1973) (Eq. 1), por sua vez, permite estimar a afinidade da substância não radioativa através do cálculo do cálculo da constante de dissociação no equilíbrio da substância obtida em ensaios de *binding*,  $K_i$ . Este parâmetro foi calculado utilizando as informações  $CI_{50}$ , concentração molar utilizada de radioligante ( $[L]$ ) e da constante de dissociação no equilíbrio do radioligante obtida em ensaios de saturação,  $K_d$ .

**Equação de Cheng-Prusoff**

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

(Equação 1)

### III.5 Teoria da determinação da atividade intrínseca através de *binding* funcional pelo método de razão de $K_i$

A atividade intrínseca de um ligante por um receptor acoplado à proteína G, tal como o receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, pode ser estimada utilizando-se um radioligante agonista e outro radioligante antagonista do receptor em presença de alta concentração de GTP, para determinar a afinidade do composto para os estados de alta e baixa afinidade do receptor, respectivamente (ASSIÉ e cols., 1999). Pelo cálculo da razão do  $K_i$  obtido nesses ensaios (Eq.2), pode-se dizer que razões significativamente maiores que 1 indicam uma substância com atividade

agonista, valores próximo a 1 sugerem atividade de antagonista e valores menores que 1 representam atividade de agonismo inverso (ASSIE e cols., 1999) (Fig.9).

$$\text{Razão } K_i = \frac{K_i (\text{ensaio antagonista})}{K_i (\text{ensaio agonista})}$$

(Equação 2)

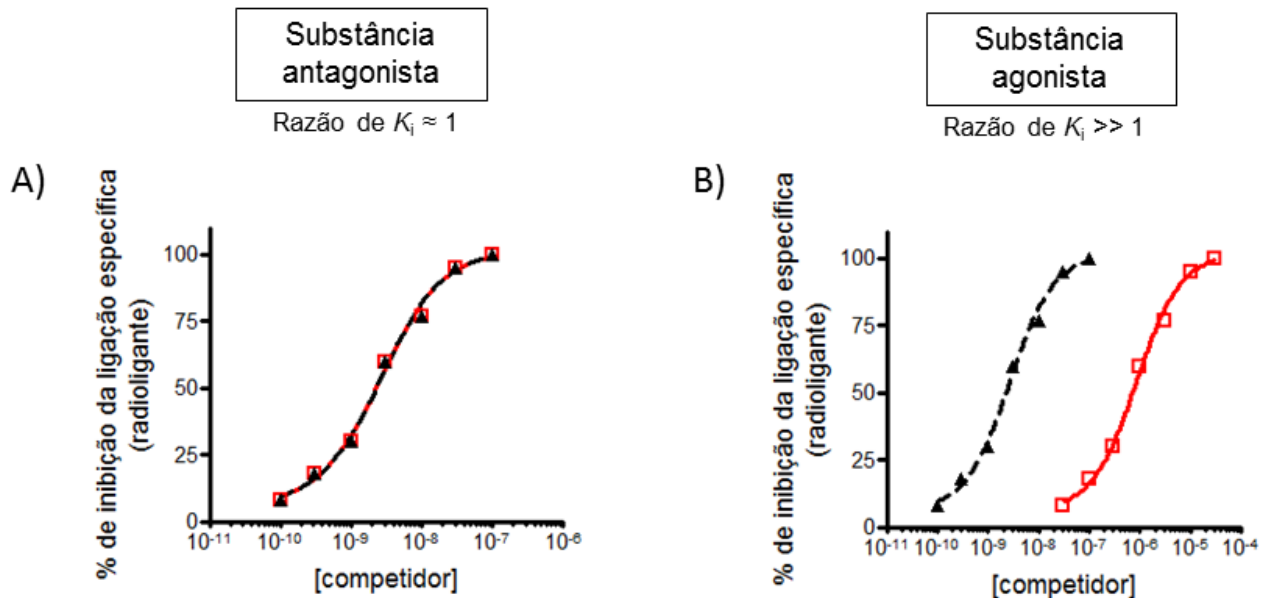


Figura 9. Gráficos teóricos que demonstram perfil de inibição da ligação do  $[^3\text{H}]$ -agonista, sem GTP ( $\blacktriangle$ , agonista) ou  $[^3\text{H}]$ -antagonista, com GTP ( $\square$ , antagonista) por substâncias não radioativas e com afinidade por receptores 5-HT<sub>1A</sub>. A) Substância antagonista, B) Substância agonista.

No gráfico A da figura 9, pode-se dizer que a substância analisada trata-se de um antagonista, pois a adição de GTP, no ensaio de ligação com  $[^3\text{H}]$ -antagonista, não alterou o perfil de inibição. Já a substância reportada no gráfico B da mesma figura apresenta atividade intrínseca de agonista, uma vez que na presença de GTP a sua curva de competição foi deslocada para direita, ou seja, houve redução da afinidade.

## III.6 Preparações membranares

### III.6.1 Preparação membranares para receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>

Os tecidos previamente armazenados em N<sub>2</sub> líquido, especificamente hipocampo de rato, enriquecido em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (HALL e cols., 1985; PEROUTKA, 1986), foram pesados e então homogeneizados no Potter em solução de Tris HCl 50 mM (pH 7,4). Posteriormente, o homogeneizado foi submetido à centrifugação de 900 x *g* por 10 minutos a temperatura de 4°C. O *pellet* obtido foi ressuspenso em aproximadamente 10 ml da solução supracitada e novamente centrifugado. O sobrenadante obtido foi adicionado ao sobrenadante oriundo da primeira centrifugação e então ultracentrifugado a 48.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O *pellet* obtido foi ressuspenso em solução de Tris HCl 50 mM (pH 7,4) e incubado a 37°C por 10 minutos com a finalidade de dissociar neurotransmissores endógenos. O conteúdo foi novamente centrifugado a 48.000 x *g* por 10 minutos a 4°C por duas vezes. O *pellet* obtido foi ressuspenso na mesma solução (Fig. 10), com auxílio de um homogeneizador manual do tipo Dounce.

Em todas as técnicas descritas de preparação membranares, o preparado protéico obtido foi aliquoteado em tubos criogênicos e armazenados em N<sub>2</sub> até sua utilização, sendo uma alíquota selecionada para ser submetida ao processo de dosagem de proteína de acordo com o método de LOWRY e cols (1951) (ver em item III.7).



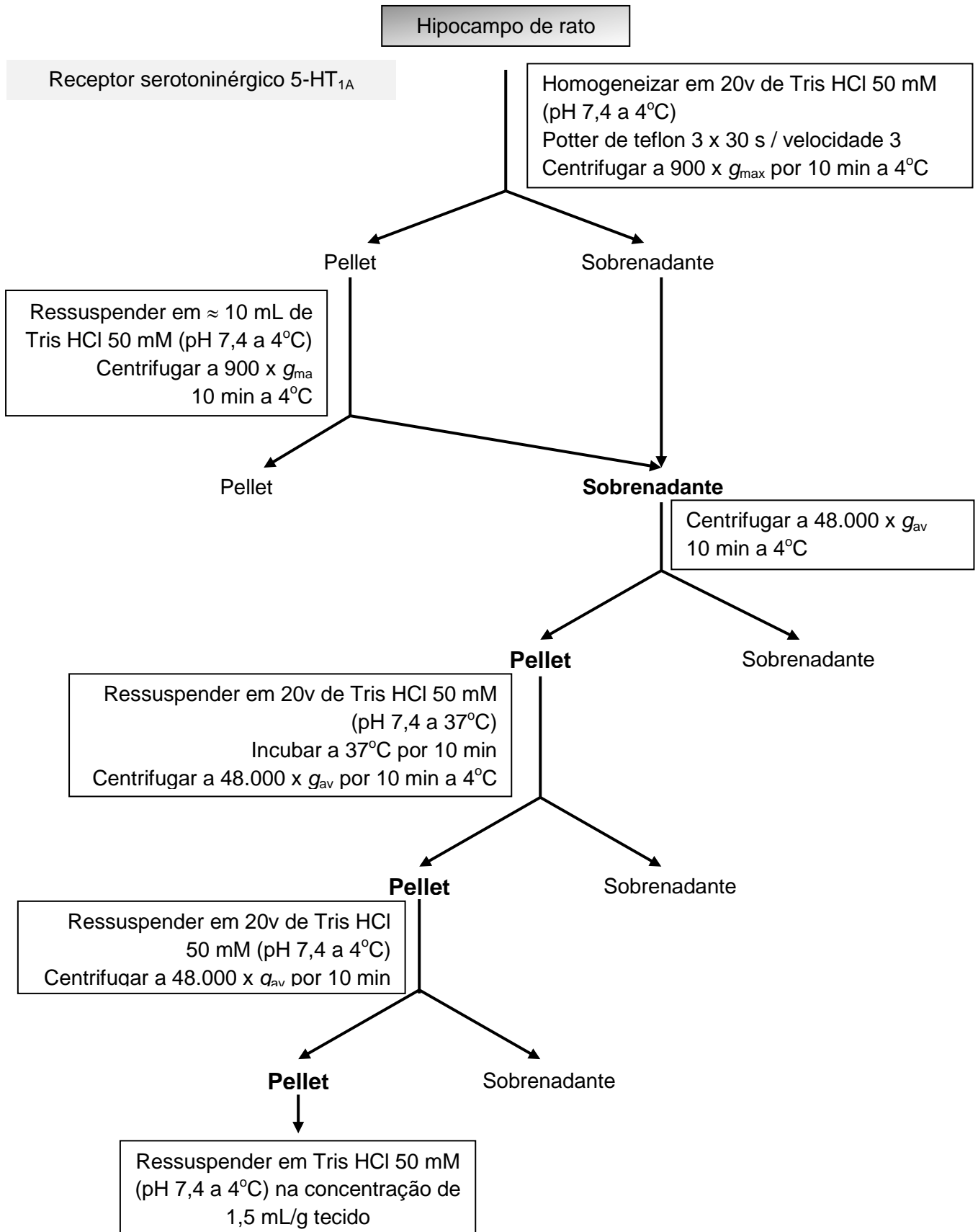


Figura 10. Esquema do protocolo de preparação membranar de hipocampo de rato (receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>).

### III.6.2 Preparação membranar para AR- $\alpha_{1A}$

O procedimento prévio à retirada do tecido segue o descrito em III.3. A próstata de rato foi retirada do animal e dissecada para obtenção da porção ventral, sob gelo, com auxílio de solução gelada Tris-HCl 5 mM, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM (pH 7,4), para AR- $\alpha_{1A}$ . Os tecidos foram armazenados em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização para preparação membranar.

Os tecidos foram homogeneizados em Potter após adição de tampão Tris-HCl 5mM, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM (pH 7,4), com auxílio de haste de teflon (aparelho motorizado Fisatom). O conteúdo foi centrifugado a 5.000 x g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante resultante foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 x g por 40 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em aproximadamente 20 ml de Tris HCl 5 mM, EDTA 2 mM (pH 7,4) e novamente ultra-centrifugado. Por fim, ressuspendeu-se o *pellet* obtido em solução de sacarose 0,25 M, Tris-HCl 5mM (pH 7,4) (OHMURA e MARAMATSU, 1995) (Fig. 11).

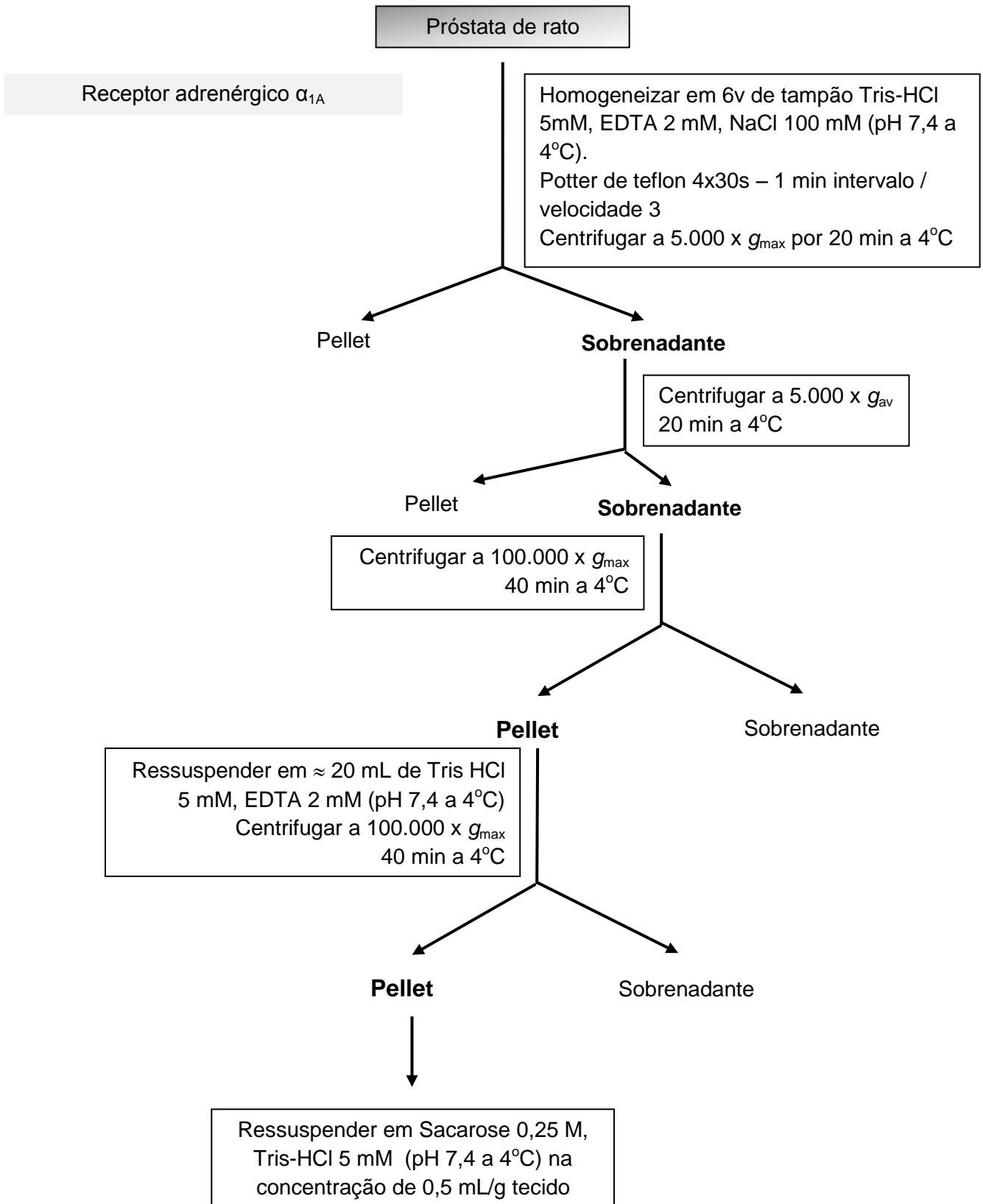


Figura 11. Esquema do protocolo de preparação membranar de próstata de rato para AR- $\alpha_{1A}$ .

### III.6.3 Preparação membranar para receptores muscarínicos M<sub>3</sub>

Após a retirada do tecido prostático, realizou-se a dissecação do tecido em solução gelada Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) para obtenção da próstata ventral. Após a adição de solução gelada Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4), o conteúdo foi homogeneizado com auxílio do homogeneizador Ultra-Turrax (velocidade 24.000 RPM). O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x *g* por 12 minutos a 4°C e o *pellet* obtido foi ressuspensão em aproximadamente 20 ml de solução Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) e novamente centrifugado. Dessa vez, o sobrenadante originado foi adicionado ao sobrenadante resultante da primeira centrifugação e então centrifugado a 40.000 x *g* por 20 minutos a 4°C. Por fim, o *pellet* foi ressuspensão na mesma solução na concentração final de 0,5 mL de solução para cada grama inicial de tecido (Fig. 12).

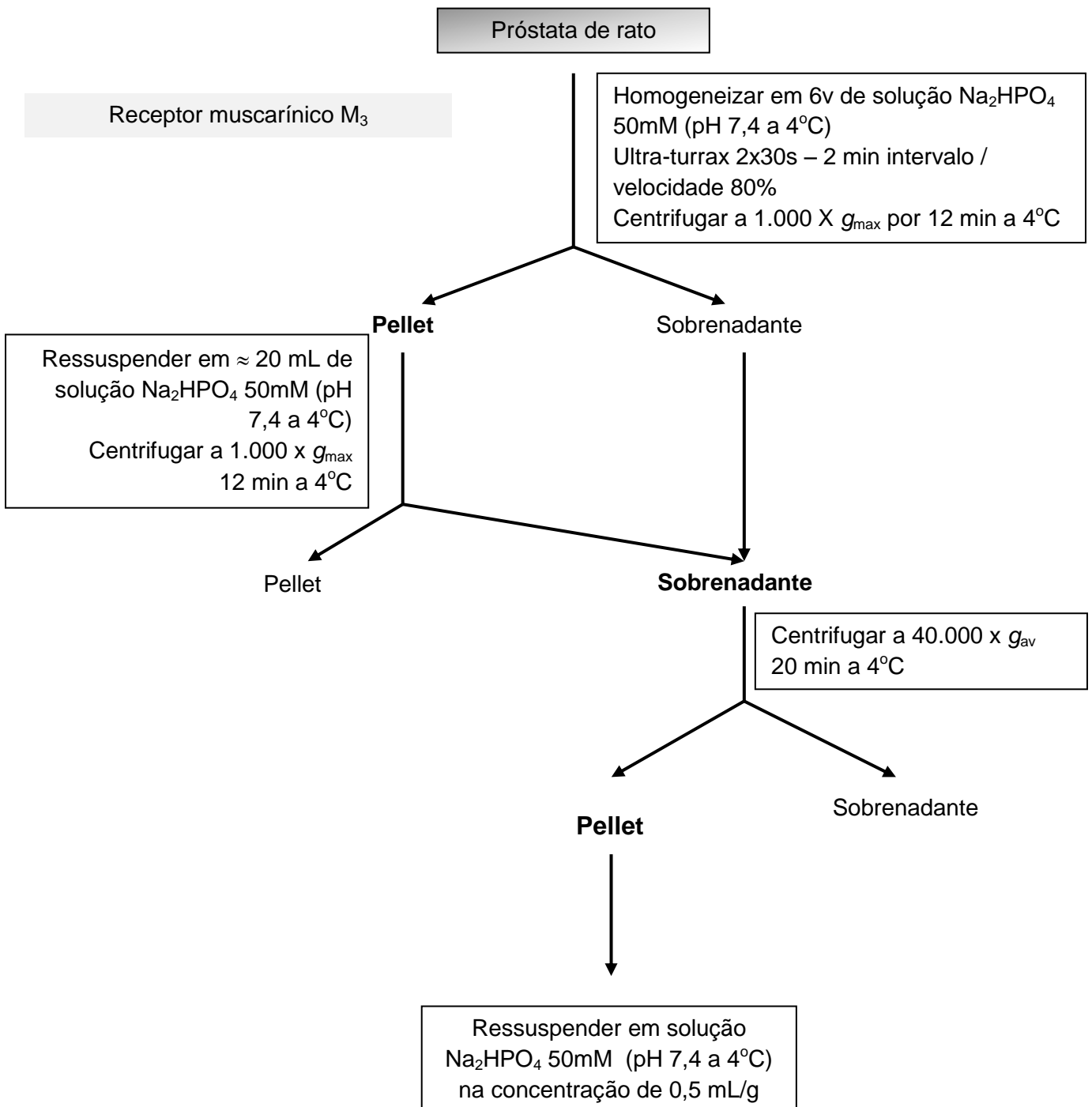


Figura 12. Esquema do protocolo de preparação membranar de próstata de rato para receptor muscarínico M<sub>3</sub>.

### III.7 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada segundo método de LOWRY e cols. (1951) adaptado para placa de 96 poços (microplaca). Tal método colorimétrico utiliza-se da comparação da absorvância apresentada pela solução contendo a

proteína a ser dosada frente a uma curva concentração-crescente de uma proteína, no caso albumina sérica bovina (BSA), de concentração conhecida. As concentrações de BSA para construção da curva padrão são 50, 100, 150, 250 e 350 µg/mL, obtidas a partir de uma solução estoque de 1.000 µg/mL

O método consistiu na adição, em um poço da placa de 96 poços, de 30 uL da amostra ou padrão (BSA) ou veículo, 20 uL H<sub>2</sub>O e 250 uL de solução carbonato dissódico 2% em NaOH 0,1N, sulfato cúprico 1% e tartarato de sódio-potássio 2%, seguida de agitação de cada poço com auxílio de uma pipeta. Após 10 minutos, adicionou-se 15 µL de reativo de Folin, agitou-se com auxílio de pipeta e incubou-se por 45 minutos a temperatura ambiente. Passado o tempo descrito, a placa foi lida no comprimento de onda de 700 nm. A curva padrão de valores de absorvância *versus* concentração de proteína pôde ser construída por regressão linear (GraphPad Prism 5.0), o que possibilita o cálculo da concentração em mg de proteína/mL do homogeneizado preparado.

### III.8 Ensaios de ligação (*binding*)

#### III.8.1 Receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (*binding* funcional)

##### A. Radioligante agonista [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT (*K<sub>i</sub>* de alta afinidade)

Conforme descrito anteriormente por NEVES e cols. (2010), no ensaio de ligação para o receptor 5-HT<sub>1A</sub> com radioligante agonista ([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT), o volume equivalente a 50 µg de preparação membranar de hipocampo de rato foi incubado por 15 minutos a 37°C em tubos (volume final de 500 µl) contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT 1 nM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, pargilina 10 µM (inibidor da monoaminoxidase). Alternativamente foi adicionada 50 µl da diluição serotonina (10<sup>-6</sup> M) para determinação da ligação não-específica, ou 50 µl da diluição de LDT3, LDT5 (10<sup>-10</sup> M - 3X10<sup>-7</sup> M, respectivamente) ou LDT8 (10<sup>-12</sup> M - 10<sup>-7</sup> M). Após o período de incubação, a reação foi parada com adição de 4 ml de solução gelada de Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), seguida por filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak®). O filtro foi lavado três vezes com a mesma solução a fim de remover o radioligante livre e seco. A contagem da radioatividade (em CPM) foi realizada em contador de cintilação líquida (PerkinElmer Tri-Carb 2810) e os filtros foram colocados em *vials* contendo 5 ml de líquido de cintilação (PPO 4%, POPOP

0,1%, p/v em tolueno). Esta etapa foi comum para todos os ensaios que utilizaram radioligante. A ligação específica do [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT foi determinada pela diferença entre a ligação total e a ligação não-específica.

O valor de  $K_d$  do [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT na preparação membranar de hipocampo de rato foi obtido da literatura (NOEL e cols., 2014), sendo 0,68 nM .

### **B. Radioligante antagonista [<sup>3</sup>H]p-MPPF ( $K_i$ de baixa afinidade)**

O ensaio foi realizado conforme descrito recentemente (CHAGAS-SILVA e cols., 2014), no qual o equivalente a 75 µg de preparação membranar de hipocampo de rato foi incubado por 45 minutos a 37°C em tubos (volume final de 500 µl) contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; [<sup>3</sup>H]p-MPPF 0,5 nM e GTP 1 mM.. Utilizou-se 50 µl da diluição de serotonina ( $10^{-6}$  M), para determinação da ligação não-específica, ou 50 µl da diluição de LDT3, LDT5 ( $10^{-10}$  M -  $3 \times 10^{-7}$  M, respectivamente) ou LDT8 ( $10^{-12}$  M -  $10^{-7}$  M).

Os parâmetros  $CI_{50}$  e  $K_i$  foram determinados conforme descrito em III.4. O valor de  $K_d$  do [<sup>3</sup>H]p-MPPF na preparação membranar de hipocampo de rato foi obtido da literatura (NOEL e cols., 2014), sendo 0,74 nM.

### **III.8.2 Receptores adrenérgicos $\alpha_{1A}$**

Segundo o protocolo descrito por MURATA e cols. (1999), o equivalente a 380 µg de preparação membranar de próstata de rato (III.6.2), tecido enriquecido em AR- $\alpha_{1A}$ , foi incubado, por 45 minutos a 30°C, com [<sup>3</sup>H]prazosina 0,1 nM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM; pH 7,4 e 50 µL de diluição prazosina ( $10^{-6}$  M), no caso da determinação da ligação não-específica, ou 50 µL das diluições do LDT3, LDT5 ou LDT8 ( $10^{-10}$  M –  $10^{-4}$  M) ou tamsulosina ( $10^{-11}$  M –  $10^{-8}$  M) ou prazosina ( $10^{-11}$  M –  $10^{-7}$  M), para um volume final de 500 µL.

Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução gelada de Tris HCl 50 mM (pH 7,4), seguida por filtração rápida a vácuo, secagem e contagem da radioatividade como descrito no item III.8.1.A. O valor de  $K_d$  da [<sup>3</sup>H]prazosina para AR- $\alpha_{1A}$  foi obtido da literatura, sendo considerado como 0,105 nM (OHMURA & MURAMATSU, 1995). Os parâmetros  $CI_{50}$  e  $K_i$  para esses receptores foram determinados conforme descrito em III.4.

### III.8.3 Receptores muscarínicos M<sub>3</sub>

Os ensaios foram realizados de acordo com o descrito por LAU & PENNEFATHER (1998). O equivalente a 190 µg de preparação membranar de próstata de rato (III.6.3), tecido que contém receptores muscarínicos M<sub>3</sub>, foi incubado (volume final de 500 µL) com [<sup>3</sup>H]QNB 0,1 nM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) por 60 minutos a 37°C. Adicionou-se, alternativamente, 50 µL de diluição de sulfato de atropina (10<sup>-6</sup> M), para determinação da ligação não-específica ou 50 µL das diluições do LDT3 ou LDT5 (10<sup>-8</sup> M – 3x10<sup>-5</sup> M) ou sulfato de atropina (10<sup>-11</sup> M – 3x10<sup>-8</sup> M).

Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 ml de solução gelada de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4), seguida por filtração rápida a vácuo, secagem e contagem da radioatividade como descrito no item III.8.1.A.

Os parâmetros CI<sub>50</sub> e K<sub>i</sub> para esses receptores foram determinados conforme descrito em III.4. O valor de K<sub>d</sub> do [<sup>3</sup>H]QNB para receptores muscarínicos foi obtido da literatura, sendo considerando como 0,05 nM (LUTHIN & WOLFE, 1984).

### III.8.4 Análise dos dados e tratamento estatístico

Os dados obtidos nos ensaios de ligação foram analisados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0 (EUA), considerando uma única população de receptores a fim de se calcular o parâmetro CI<sub>50</sub>.

A diferença entre os grupos experimentais foi analisada por análise de variância fator único (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* Newman-Keuls (mais de 2 grupos). A análise estatística entre dois grupos foi analisada por teste *t* de Student, considerando, em ambos os casos, *P* < 0,05.

Nos ensaios de *binding* funcional, o cálculo das razões de K<sub>i</sub> e os respectivos intervalos de confiança (95%) foram calculados seguindo o princípio de razões de duas médias com distribuição normal. Para tanto, utilizamos os valores de *p*K<sub>i</sub>, número de experimentos e desvio padrão de cada condição experimental (ensaio antagonista e ensaio agonista). As análises foram realizadas via teste *t* de Student (two-tail; GraphPad Prism 5.0) e considerando os parâmetros calculados, a saber: diferença entre as médias, erro padrão (SE<sub>D</sub>), graus de liberdade e valor de *t* para *p* < 0,05 (ROBERTSON & LUMLEY, 1989).



### III.9 Ensaio funcional de órgão isolado (contração isométrica)

Experimentos de contração isométrica foram realizados utilizando ratos Wistar machos (250-300g), que após anestesia e sacrifício, tiveram os órgãos próstata e bexiga retirados e dissecados de modo a obter a próstata ventral e o corpo da bexiga.

#### III.9.1 Próstata

A próstata de rato (predominantemente receptores muscarínicos  $M_3$ ) foi removida, livre dos tecidos adjacentes e uma tira de aproximadamente 2 mm de largura e 5-10 mm de comprimento foi preparada de cada lobo. Após serem amarradas com auxílio de linha cirúrgica, as tiras foram individualmente conectadas a um transdutor de tensão (GRASS FT-03) e mergulhadas em cubas contendo 9 ml de solução fisiológica (em mM: NaCl 118,1,  $\text{NaHCO}_3$  25, glicose 11,7, KCl 4,69,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{MgSO}_4$  0,5 e  $\text{CaCl}_2$  2,5), mantidos a  $37^\circ\text{C}$  sob aeração de mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) (Fig. 13). As tiras foram submetidas a uma força, dita pré-carga, de 10 mN por 60 minutos, corrigida a cada 15 minutos. Passado esse período, foi realizado um estímulo despolarizante com solução de KCl contendo em mM: NaCl 18,1,  $\text{NaHCO}_3$  25, glicose 11,7, KCl 100,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{MgSO}_4$  0,5 e  $\text{CaCl}_2$  2,5. No platô da contração, realizou-se a lavagem da cuba, retornando à solução fisiológica inicial. O procedimento foi repetido após 15 minutos e a solução foi mantida em repouso por mais 30 minutos. Apenas as tiras que apresentaram contração semelhante nos dois estímulos com solução de KCl 100 mM foram utilizadas. Realizou-se, então, curvas cumulativas ao carbacol ( $10^{-8}$  M –  $3 \times 10^{-4}$  M) antes e após a incubação com LDT 3 ( $3 \times 10^{-9}$  M) ou do LDT 5 ( $10^{-8}$  M), adicionados 1 hora antes (HOMMA e cols., 2000) (Fig. 14). Alternativamente foram usados também atropina ( $10^{-9}$  M, antagonista muscarínico não seletivo) ou prazosina ( $10^{-9}$  M, antagonista de  $\text{AR-}\alpha_1$ ). Controles temporais também foram realizados com a adição de veículo de diluição das substâncias (água ultrapura MilliQ<sup>®</sup>) pelo mesmo período de 1 hora antes da segunda curva concentração-resposta ao carbacol.

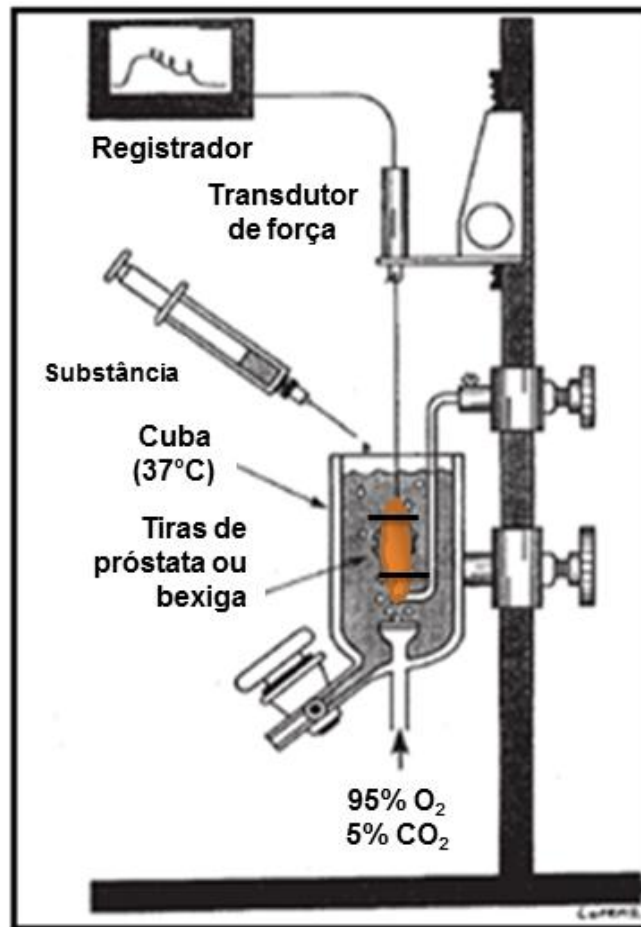


Figura 13. Representação esquemática do sistema de órgão isolado onde ensaios funcionais com próstata ou bexiga de rato foram realizados (modificado de EVORA e cols., 1999).

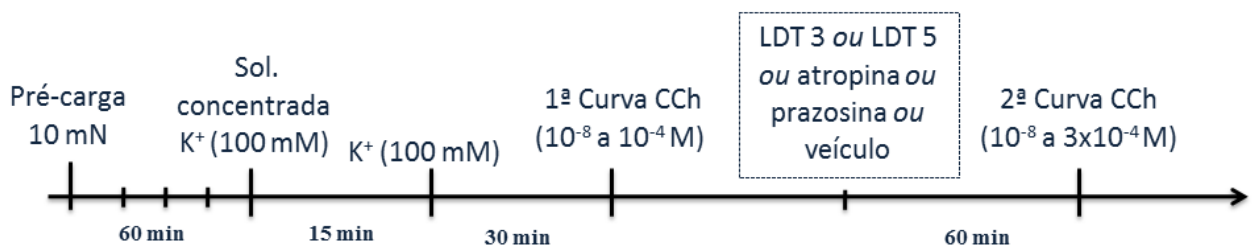


Figura 14. Esquema temporal do ensaio funcional com próstata de rato.

A variação da força gerada, medida em mN, foi detectada através do transdutor de força isométrica GRASS FT-03. Os dados foram digitalizados no sistema MacLab 8S, conectado ao transdutor, e então analisados com auxílio do *software* Chart 3.4/s (MacLab, Inc., USA).

Curvas concentração-resposta ao agonista carbacol na presença ou ausência da substância puderam ser construídas e, com auxílio do *software* GraphPad Prism

5.0, tiveram sua concentração necessária para se obter 50% do efeito máximo –  $E_{max}$  – observado,  $CE_{50}$ , determinada. Caso a curva na presença da substância apresentasse um deslocamento para direita, pode-se sugerir que a mesma possui uma atividade intrínseca de antagonista (Fig. 15).

A razão entre o valor de  $CE_{50}$  na presença e na ausência da substância corresponde ao parâmetro denominado “razão da concentração”, ou CR. Tais parâmetros puderam ser analisados pela Equação de Schild de modo a estimar a afinidade das substâncias pelo receptor em questão (Eq. 3) (KENAKIN, 1993).

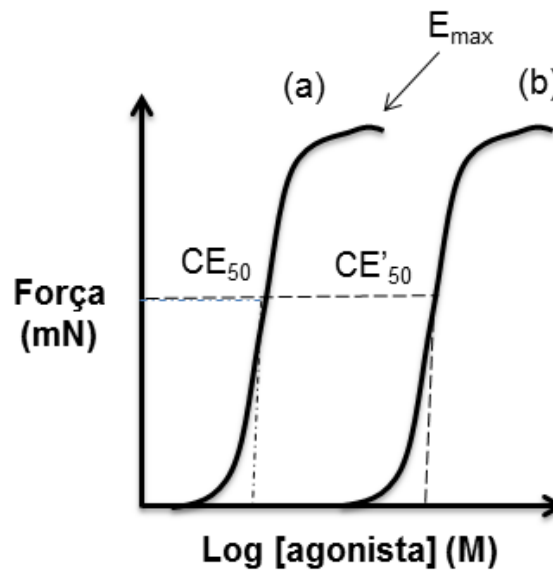


Figura 15. Curva concentração-resposta hipotética do agonista na ausência (a) ou presença (b) de uma substância antagonista.

(Equação 3) 

$$\text{Equação de Schild}$$

$$(\log CR - 1) = \log [B] - \log K_b$$
, na qual

CR = razão da concentração ( $CE'_{50}/CE_{50}$ ); [B] = concentração do antagonista “B”;  $K_B$  = constante de equilíbrio de dissociação do antagonista “B”.

### III.9.2 Bexiga

O ensaio com bexiga de rato (tecido enriquecido com receptores muscarínicos  $M_3$ ) foi semelhante ao descrito para próstata de rato.

Após a remoção da bexiga e retirada de tecidos adjacentes, seu corpo foi cortado em três tiras longitudinais de aproximadamente 2 mm de largura. Cada tira foi devidamente amarrada com auxílio de linha cirúrgica e então conectada ao

transdutor de tensão (GRASS FT-03) e mergulhada em cubas de 9 ml contendo solução fisiológica (idem III.9.1), mantidas a 37°C e sob aeração com mistura carbogênica. Os segmentos foram submetidos a uma pré carga de 10 mN por 90 minutos, corrigida a cada 30 minutos, de modo a estabilizar o tecido e então uma contração com solução despolarizante de KCl (40 mM) (em mM: NaCl 78,1, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glicose 11,7, KCl 40, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 0,5 e CaCl<sub>2</sub> 2,5) foi realizada. Ao atingir o platô da contração, o tecido foi lavado e após 15 minutos o mesmo procedimento foi repetido. Apenas as tiras que apresentaram contração semelhante em ambos os estímulos com KCl foram utilizadas. Após 30 minutos, curvas cumulativas ao carbacol ( $3 \times 10^{-9}$  M –  $10^{-4}$  M) foram realizadas antes e após a incubação com atropina ( $10^{-9}$  M) ou LDT 3 ( $3 \times 10^{-7}$  M) (Fig. 16).

Controles temporais também foram realizados com a adição de veículo de diluição das substâncias (água ultrapura MilliQ<sup>®</sup>) pelo mesmo período de 1 hora antes da segunda curva concentração-resposta ao carbacol.

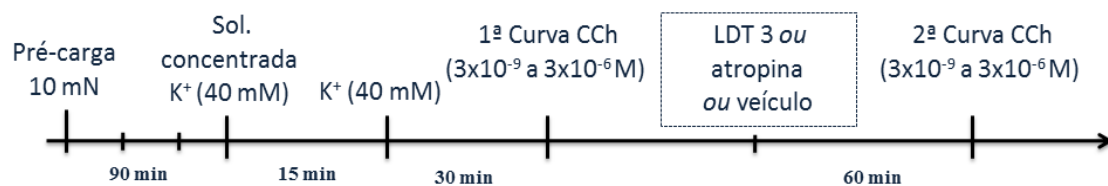


Figura 16. Esquema temporal do ensaio funcional com bexiga de rato.

A análise do experimento seguiu o descrito em III.5.1.

### III.9.3 Análise dos dados e tratamento estatístico

Os dados absolutos de força (mN) ou dados normalizados (%) em relação ao efeito máximo do agonista na primeira curva concentração-resposta foram analisados por regressão não-linear para cálculo dos parâmetros  $E_{max}$  e  $CE_{50}$ , utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0, EUA. A análise estatística entre dois grupos foi analisada por teste *t* de Student.



## IV.1 Ensaios de ligação (*binding*)

### IV.1.1 Receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (*binding* funcional)

Segundo HALL e cols.(1985) e PEROUTKA (1986), a preparação membranar de hipocampo de rato contém alta densidade de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>.

Em ensaios realizados com preparação de hipocampo de rato, [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT e [<sup>3</sup>H]*p*-MPPF apresentaram os valores de  $K_d$  0,68 nM e 0,74 nM, respectivamente (NOËL e cols., 2014).

LDT3, LDT5 e LDT8 competiram de forma concentração-dependente com a ligação específica do [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT (radioligante agonista) (Fig. 17), com valores de  $K_i$  na faixa nanomolar (Tabela 1) (NASCIMENTO, 2011).

LDT8 apresentou menor valor de  $CI_{50}$ , como pode ser observado na figura 17, onde a curva de inibição se apresentou mais à esquerda. O cálculo do valor de  $K_i$  também revelou maior afinidade do LDT8 por receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Por outro lado as curvas dos LDT3 e LDT5 foram praticamente sobrepostas sugerindo afinidades semelhantes (Tabela 1).

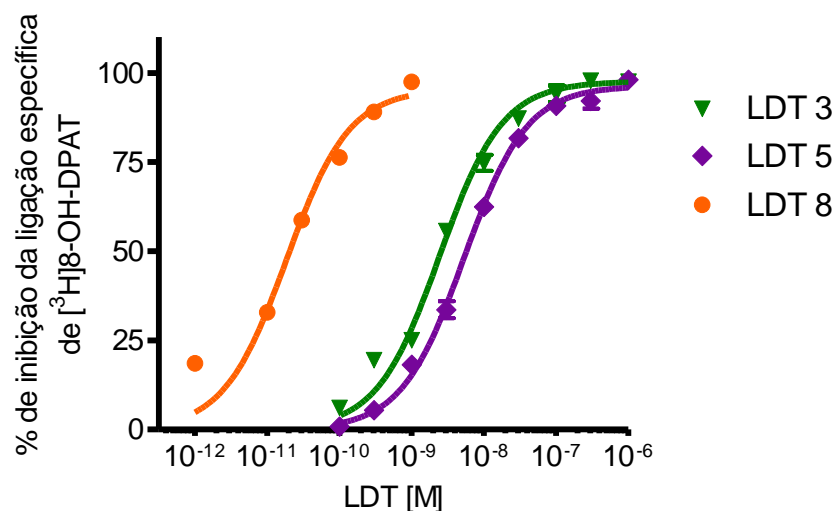


Figura 17. Inibição da ligação específica do [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT em membrana de hipocampo de rato pelos derivados LDT3, LDT5 e LDT8. A figura representa média ± EPM de 2-4 experimentos individuais realizados em triplicata.

LDT3, LDT5 e LDT8 também competiram com a ligação específica do [ $^3\text{H}$ ]-*p*-MPPF (radioligante antagonista) na faixa nM (Fig. 18), sendo a ordem de  $\text{CI}_{50}$  de  $\text{LDT8} > \text{LDT3} > \text{LDT5}$  (Tabela 1).

A análise das razões de  $K_i$  revelou que LDT3 e LDT5 apresentaram razões próximas a 1, compatível com atividade intrínseca de antagonista (Tabela 1). Neste protocolo, a serotonina apresentou razão de  $K_i$  de 76,8 compatível com agonista pleno (CHAGAS-SILVA e cols., 2014). Por outro lado, LDT8 apresentou razão significativamente maior que 1, valor compatível com a de um agonista pleno neste ensaio, porém menor que o da 5-HT nas mesmas condições experimentais. Contudo, ensaios posteriores com cultura de células prostáticas permitiram constatar a atividade intrínseca de agonista parcial do LDT8 (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015).

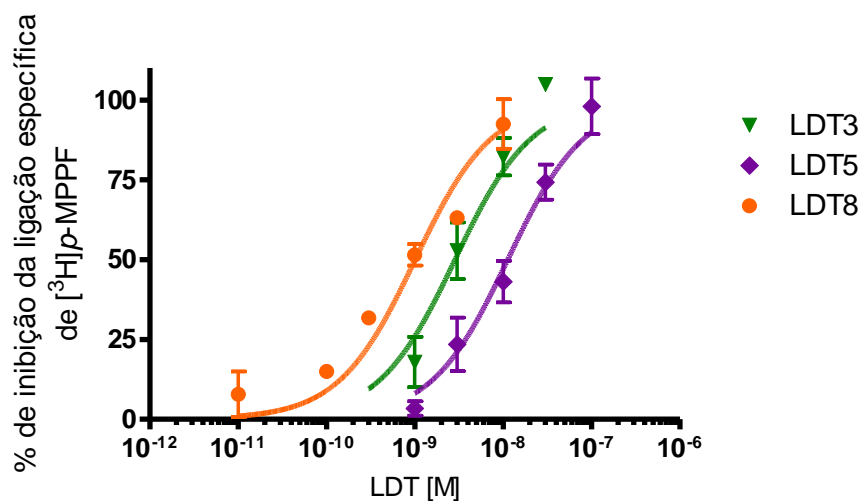


Figura 18. Inibição da ligação específica do [ $^3\text{H}$ ]-*p*-MPPF em membrana de hipocampo de rato pelos derivados LDT3, LDT5 e LDT8. A figura representa média  $\pm$  EPM de 2 ou 3 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 1: Parâmetros farmacológicos e razão de  $K_i$  dos derivados LDT3, LDT5 e LDT8 em receptores 5-HT<sub>1A</sub> de hipocampo de rato.

LDT	<sup>3</sup> H]8-OH-DPAT		<sup>3</sup> H]ρ-MPPF		Razão de $K_i$ (IC 95%)
	$pK_i \pm EPM^a$	$K_i^b$ (nM) alta afinidade	$pK_i \pm EPM^a$	$K_i^b$ (nM) baixa afinidade	
3	8,95 ± 0,03***	1,12	8,76 ± 0,11	1,73	1,53 [1,02-2,81]
5	8,60 ± 0,02***	2,51	8,16 ± 0,09***	6,91	2,75 [1,68-4,50]
8	11,05 ± 0,02	0,009	9,21 ± 0,05	0,62	66,9 [44,98-99,77]

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± EPM;

<sup>b</sup> Valores de  $K_i$  foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff, usando os valores de 0,68 nM e 0,74 nM como  $K_i$  da [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT e [<sup>3</sup>H]ρ-MPPF, respectivamente; N = 2-4.

\*\*\* P < 0.001 vs. LDT8. Os valores de  $K_i$  na condição [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT foram obtidos por Nascimento (2011).

Em virtude do perfil agonista do LDT8 em receptores 5-HT<sub>1A</sub>, contrário ao perfil desejável para um novo fármaco para tratamento da HPB, nos estudos subsequentes ele não foi mais avaliado.

#### IV.1.2 Receptores adrenérgicos $\alpha_{1A}$ prostáticos

Conforme descrito por HIRAOKA e cols. (1999), o tecido prostático do rato expressa de forma majoritária o subtipo de AR- $\alpha_{1A}$ .

Em ensaios de competição, os gráficos de LDT3 e LDT5 demonstraram perfil monofásico (Fig. 19), sendo que tais substâncias apresentaram alta afinidade pelo receptor em questão, com valor de  $K_i$  na faixa nM (Tabela 2). A tamsulosina, utilizada no tratamento da HPB, também apresentou tal perfil (dados não mostrados). Para prazosina, a análise dos dados indicou melhor ajuste considerando o modelo de dois sítios de afinidade como reportado na literatura (MURAMATSU e cols., 1990; OHMURA & MURAMATSU, 1995; FUKASAWA e cols., 1998). Contudo, apenas o sítio de ligação de alta afinidade corresponde ao AR- $\alpha_{1A}$  (MURAMATSU e cols., 1995). Para prazosina observamos um valor médio de  $CI_{50}$  de 0,015 nM (Tabela 2).



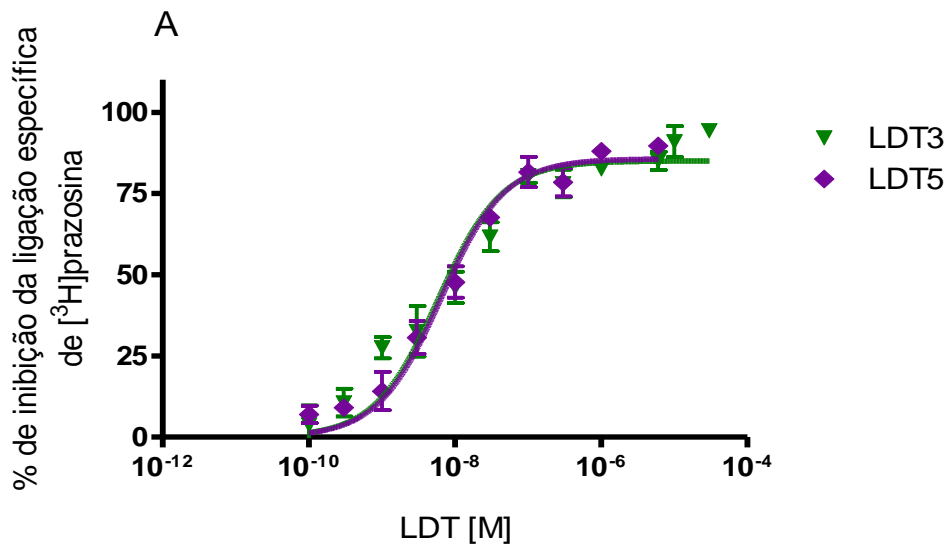


Figura 19. Inibição da ligação específica da  $[^3\text{H}]$ prazosina em membrana de próstata de rato pelos LDT3 e LDT5. A figura representa média  $\pm$  EPM de 3 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 2: Parâmetros farmacológicos do LDT3, LDT5, prazosina e tamsulosina em AR- $\alpha_{1A}$  de próstata de rato.

Substância	$-\log \text{CI}_{50} \pm \text{EPM}^a$	$K_i^b$ (nM)
LDT3	$8,23 \pm 0,11$	3,02
LDT5	$8,19 \pm 0,07$	3,31
prazosina <sup>c</sup>	$10,82 \pm 0,29$	0,008
tamsulosina	$10,72 \pm 0,16$	0,010

<sup>a</sup> Valores de  $\text{CI}_{50}$  foram calculados por regressão não-linear e expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 3 - 5$ ); <sup>b</sup> Valores de  $K_i$  foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff, utilizando como  $K_d$  o valor de 0,105 nM (OHMURA & MURAMATSU, 1995); <sup>c</sup>  $K_i$  referente ao sítio de alta afinidade;  $n = 2$  para prazosina;  $n=3$  para demais substâncias.

#### IV.1.3 Receptores muscarínicos $M_3$ prostáticos

Conforme descrito por LAU & PENNEFATHER (1998) e YAZAWA & HONDA (1993), o tecido prostático pode ser utilizado de modo a se obter uma preparação enriquecida com receptores muscarínicos  $M_3$ .

Previamente à realização dos ensaios de competição com receptores muscarínicos prostáticos, realizou-se uma cinética a fim de verificar a existência de variação da ligação específica em diferentes tempos de incubação na temperatura de 37°C (Fig. 20). A ligação total (T), assim como a ligação não específica (NS),

permaneceram estáveis ao longo do período estudado, sugerindo que a ligação específica atinge rapidamente o equilíbrio (30 minutos). A ligação específica permaneceu estável por até 120 minutos (Fig. 20). Considerando o tempo de incubação reportado em estudos na literatura para esse ensaio e protocolo padronizado pelo laboratório para *binding* com tecido de córtex de rato, escolheu-se o tempo de incubação de 60 minutos para o ensaio de competição.

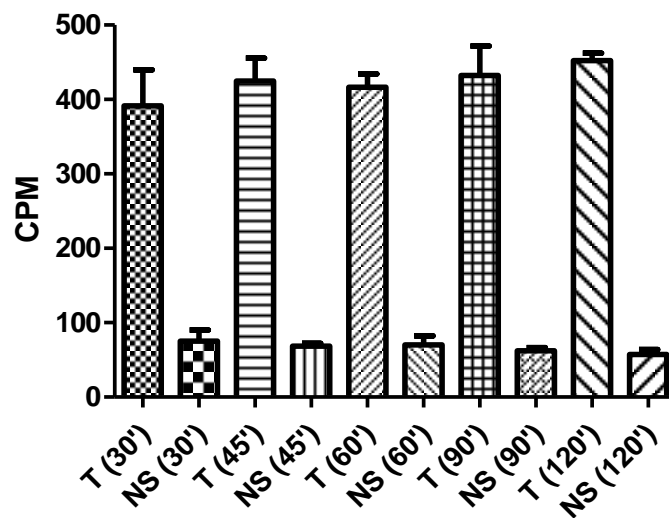


Figura 20. Cinética temporal de ligação específica do radioligante [ $^3\text{H}$ ]QNB na ausência (ligação total - T) e presença (ligação não específica - NS) do competidor atropina expressa em contagem por minuto (CPM). A figura representa média  $\pm$  EPM de 3 experimentos realizados em triplicata.

O antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, atropina, apresentou alta afinidade por esses receptores, semelhante ao reportado pela literatura (LAU & PENNEFATHER, 1998) (Fig. 21). Por outro lado, LDT3 e LDT5 apresentaram baixa afinidade, na faixa  $\mu\text{M}$ , sendo que o  $K_i$  do LDT5 não pode ser determinado, pois a curva de inibição não atingiu 50% de inibição (Fig. 22; tabela 3).

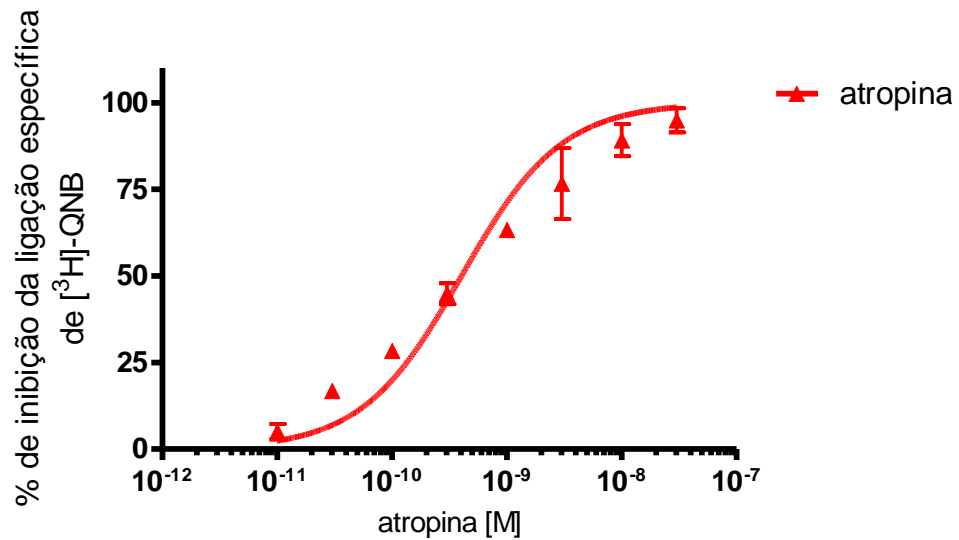


Figura 21. Inibição da ligação específica do  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  em membranas de próstata de rato pela atropina. A figura representa média  $\pm$  EPM ( $n=2$ ). Os dados foram analisados considerando uma população de receptores.

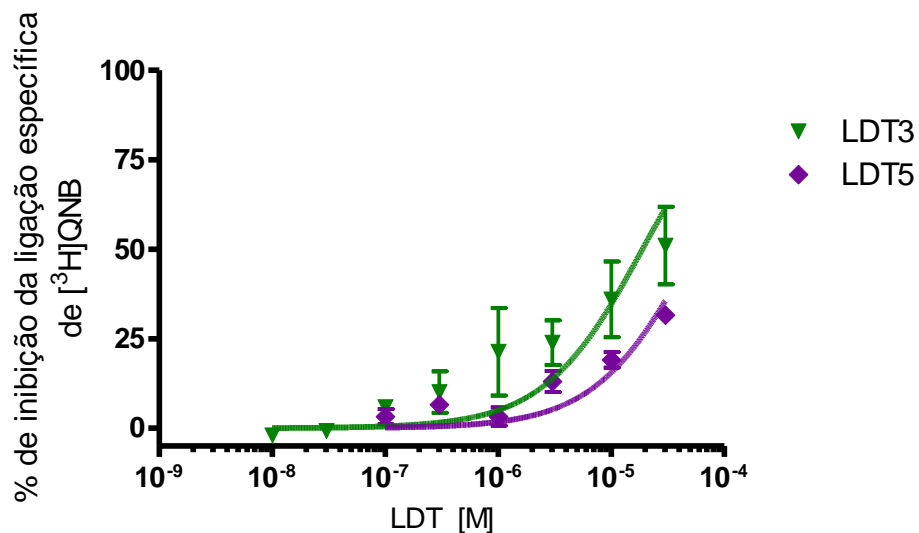


Figura 22. Inibição da ligação específica do  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  em membranas de próstata de rato pelos LDT3 e LDT5. A figura representa média  $\pm$  EPM ( $n=2-4$ ).

Tabela 3: Parâmetros farmacológicos do LDT3 e atropina em receptores muscarínicos  $M_3$  de próstata de rato.

Substância	$-\log \text{CI}_{50} \pm \text{EPM}^a$	$K_i^b$ (M)
LDT3	$4,72 \pm 0,11$	$6,35 \times 10^{-6}$
LDT5	$>300 \text{ nM}$	ND <sup>c</sup>
atropina	$9,40 \pm 0,08$	$0,13 \times 10^{-9}$

<sup>a</sup> Valores de  $\text{CI}_{50}$  foram calculados por regressão não-linear e expressos como média  $\pm$  EPM; <sup>b</sup> Valores de  $K_i$  foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff, utilizando como  $K_i$  o valor de  $0,05 \text{ nM}$  (LUTHIN & WOLFE, 1984). <sup>c</sup> ND = Não determinado;  $n=2$  para atropina e LDT3 e  $n=4$  para LDT5.

## IV.2 Ensaio funcionais de órgão isolado

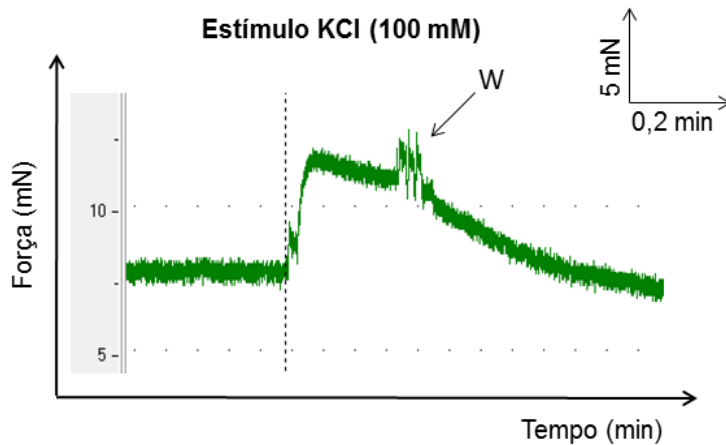
### IV.2.1 Inibição da contração induzida por carbacol em próstata de rato

Segundo WHITE e cols. (2011), assim como LAU & PENNEFATHER (1998), a próstata de rato corresponde a um tecido que expressa receptores muscarínicos  $M_3$  e que estes são responsáveis pela contração de sua musculatura lisa. Desta forma, ensaios funcionais de contração isométrica em órgão isolado foram realizados nesses tecidos a fim de estimar a afinidade dos LDT's bem como suas atividades intrínsecas,

LDT3 e LDT5 foram pré-incubados por 1h em uma concentração elevada (100 nM), porém não foram capazes de alterar a linha basal. Sendo assim, descartou-se um possível efeito agonista de contração na concentração utilizada.

A próstata de rato apresentou pequena contração tônica após estímulo com solução despolarizante com KCl 100 mM (aproximadamente 5 mN) (Fig. 23A). Por outro lado, o carbacol (0,3 mM) induziu contração que representou em media 40% da resposta contrátil observada com KCl (Fig. 23B). Após adição de atropina (10 nM), observou-se a necessidade de maior concentração de CCh para início da contração do tecido (medido em força (mN)) (Fig. 23B).

A)



B)

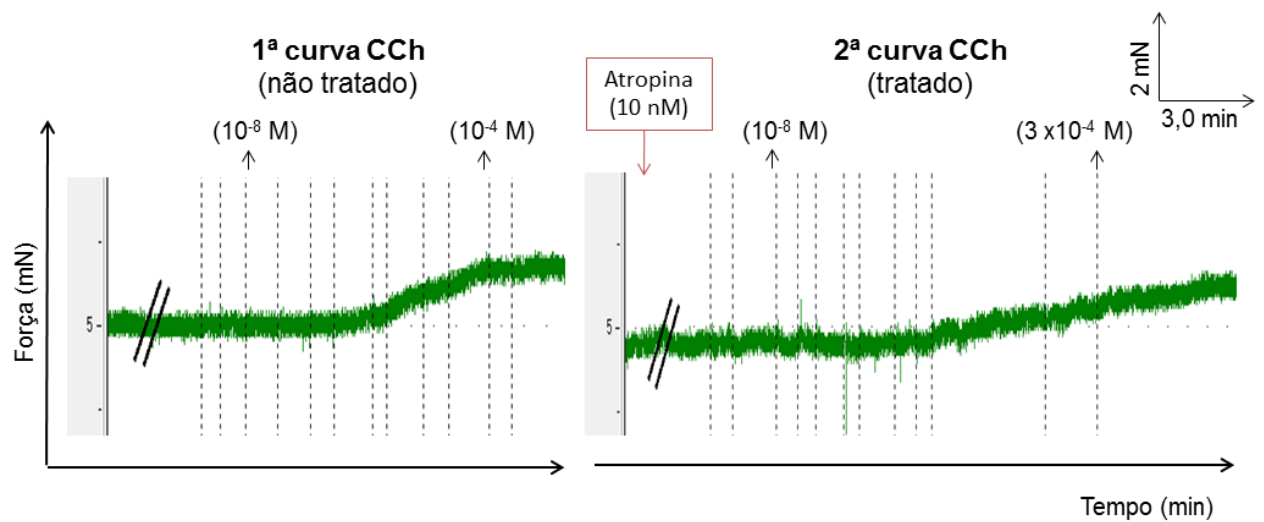


Figura 23. Registro típico do ensaio de contração isométrica da próstata de rato. A) Estímulo com solução de KCl 100 mM. B) Adição de carbacol (CCh) de forma cumulativa na ausência (esquerda) ou presença (direita) de atropina (10 nM), após 1 hora de incubação.

Na curva controle, o carbacol apresentou  $CE_{50}$  de 1,3  $\mu$ M, semelhante ao reportado na literatura (LAU & PENNEFATHER, 1998). A preparação manteve a contração na segunda curva ao carbacol (Fig. 24;  $CE_{50}$  = 1,9  $\mu$ M, n = 3), descartando assim algum artefato temporal. Os dados foram normalizados considerando como 100% a contração máxima obtida na primeira curva de CCh.

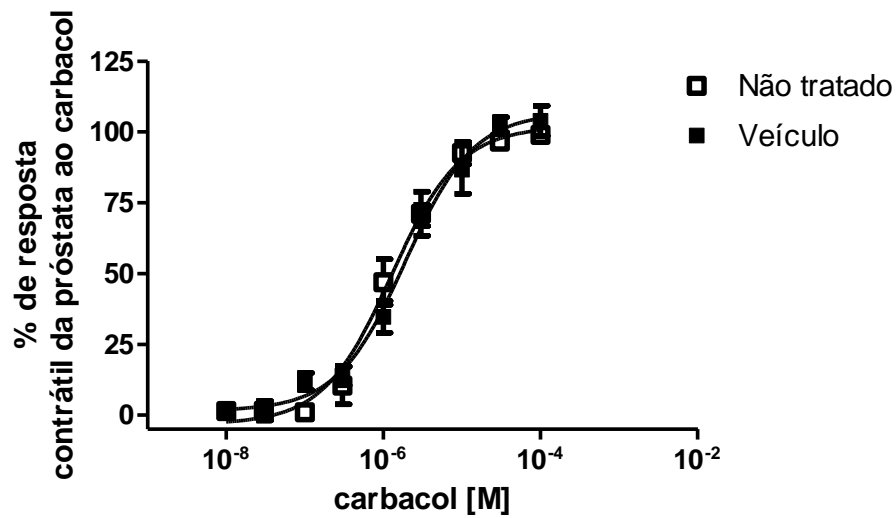


Figura 24. Curvas concentração-resposta ao carbacol em próstata de rato na ausência (□) ou presença (■) do veículo utilizado para diluição das substâncias. Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=3).

Curvas cumulativas de carbacol foram construídas antes e após o tratamento com atropina (10 nM), LDT3 (30 nM) ou LDT5 (100 nM).

A atropina (10 nM) deslocou a curva de contração induzida por carbacol, aumentando a  $CE_{50}$  do carbacol de 3,7  $\mu$ M para 70,5  $\mu$ M (Fig. 25A). O LDT3 (30 nM) causou pequeno deslocamento (Fig. 25B) e o LDT5, mesmo na concentração de 100 nM, não teve efeito considerável (Fig. 25C).

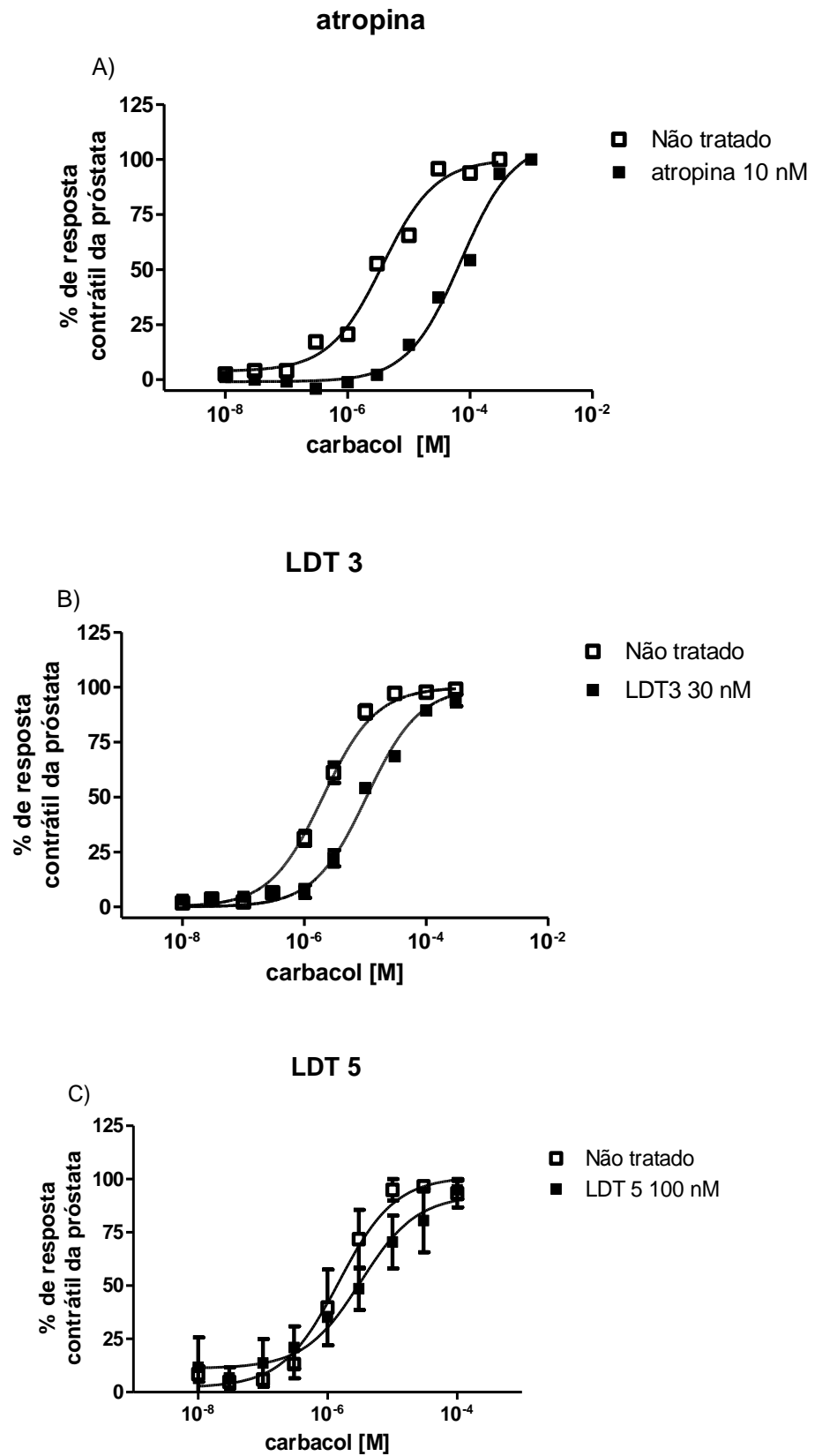


Figura 25. Curvas concentração-resposta ao carbacol em próstata de rato na ausência (□) ou presença (■) da atropina (10 nM), do LDT3 (30 nM) ou LDT5 (100 nM). Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=3-4), com exceção do experimento com atropina (n=1).

A adição de atropina acarretou no resultado esperado por se tratar de um antagonista de receptores muscarínicos, com  $K_B$  de 0,46 nM (Tabela 4), semelhante ao relatado na literatura (LAU & PENNEFATHER, 1998). Para o LDT3 sugere-se que seja antagonista de receptores muscarínicos, com  $K_B$  de 7,81 nM, por deslocar para direita a curva concentração-resposta do carbacol, aumentando o valor de  $CE_{50}$  do agonista (Tabela 4). O LDT5, por sua vez, não foi capaz de causar deslocamento na curva concentração-resposta do carbacol na concentração de 100 nM utilizada, não sendo possível calcular seu  $K_B$  pela equação de Schild.

Tabela 4: Afinidade aparente do LDT3 e LDT5 receptores muscarínicos determinada por ensaios funcionais em próstata de rato.

Substância	-log $CE_{50} \pm$ EPM (M)		CR <sup>b</sup>	-log $K_B \pm$	$K_B$ (nM) <sup>a</sup>	N
	Controle	Tratado		EPM (M)		
LDT3 (30 nM)	5,68 $\pm$ 0,05	4,99 $\pm$ 0,03	4,90	8,11 $\pm$ 0,03	7,81	4
LDT5 (100 nM)	5,8 $\pm$ 0,13	5,5 $\pm$ 0,18	ND	ND	ND	2
atropina (10 nM)	5,5	4,1	23,0	9,34	0,46	1

<sup>a</sup>Valores de  $K_B$  obtidos a partir dos experimentos funcionais na presença de LDT ou atropina utilizando a equação de Schild. Valores de  $CE_{50}$  obtidos na análise por regressão não linear.

<sup>b</sup>CR (razão entre as  $CE_{50}$  na presença e ausência da substância) é a média dos valores de CR's

A afinidade apresentada pelo LDT3 para receptores muscarínicos  $M_3$  determinada em ensaios funcionais com próstata de rato ( $K_B = 7,81$  nM) se assemelha à encontrada para AR- $\alpha_{1A}$  em ensaios de binding ( $K_i = 3,02$  nM). Porém tal resultado não corrobora com o perfil de baixa afinidade apresentado pelo LDT3 para receptores muscarínicos  $M_3$  em ensaios de *binding*. Pelo já relatado na literatura, GPCR da família rodopsina podem formar homodímeros ou heterodímeros (PIN e cols., 2007), sendo que a ativação de apenas um monômero seria suficiente para ativação da proteína G. Pela diferença de afinidade encontrada para o LDT3 para os receptores muscarínicos  $M_3$ , suspeitou-se da possibilidade dos receptores muscarínicos e AR- $\alpha_{1A}$  presentes nesse tecido estarem acoplados a ponto de interferirem na sinalização intracelular e, por fim, na contração. Sendo assim, testou-se um antagonista clássico de AR- $\alpha_1$ , prazosina, em ensaio com contração prostática mediada por agonista muscarínico (carbacol).



A adição de prazosina (Fig. 26) não foi capaz de deslocar a curva concentração-resposta do carbacol, indicando não haver interferência na contração mediada por carbacol por antagonismo em AR- $\alpha_1$  na próstata de rato no modelo de contração utilizado.

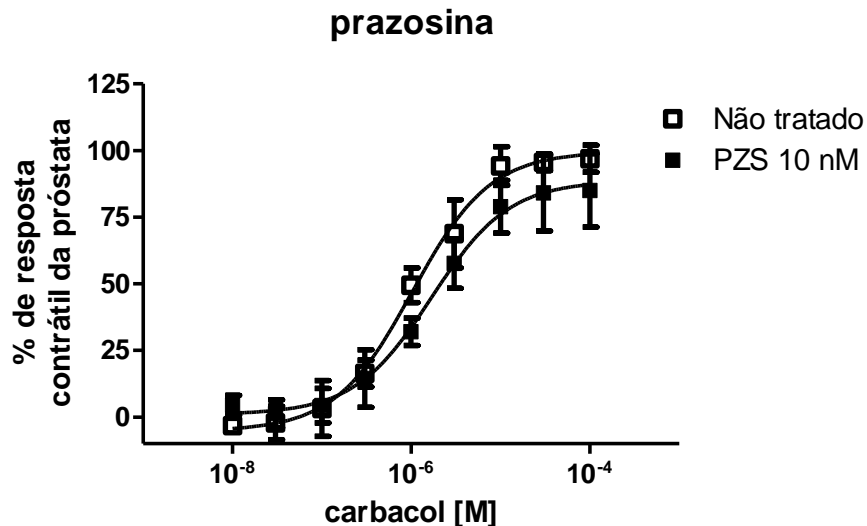


Figura 26. Curvas concentração-resposta ao carbacol em próstata de rato na ausência ( $\square$ ) ou presença ( $\blacksquare$ ) da prazosina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=3-4).

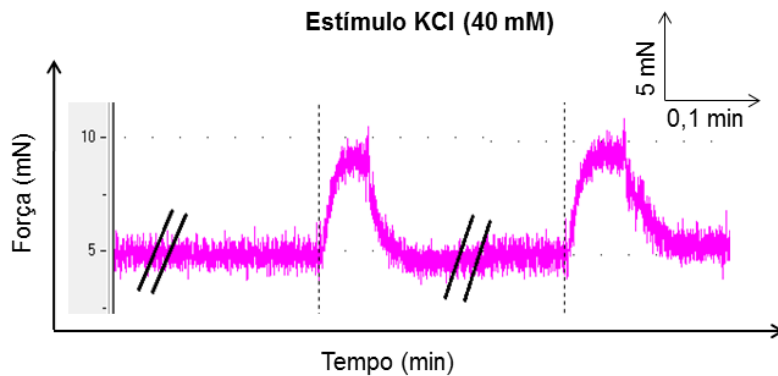
#### IV.2.2 Inibição da contração induzida por carbacol em bexiga de rato

De acordo com COHEN & DREY (1988), HEDGE e cols. (1997) e SCHNEIDER e cols. (2014), a bexiga de rato é um tecido que expressa receptores muscarínicos  $M_3$  funcionais que são responsáveis pela contração do músculo detrusor. Sendo assim, foram realizados ensaios funcionais de contração em modelo de órgão isolado utilizando esses tecidos a fim de determinar a afinidade e atividade intrínseca do LDT3.

Antes da realização dos ensaios, o tecido foi exposto a dois estímulos via solução concentrada de KCl (40 mM) a fim de se verificar a capacidade contrátil do mesmo.

A tira de bexiga apresentou contração espontânea, sendo que a substância agonista aumentou a amplitude da contração (Fig. 27B). O registro da força contrátil do tecido, em mN, permitiu observar o efeito causado pela adição do carbacol apresentando contração ativa de ~ 12,5 mN, notavelmente superior ao observado na próstata (Fig. 23).

A)



B)

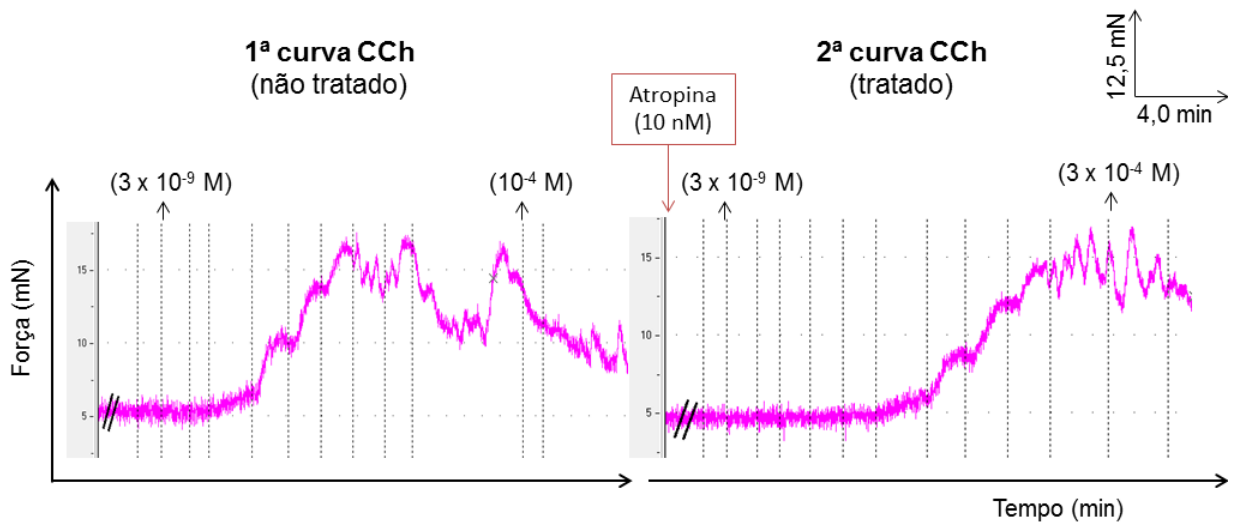


Figura 27. Registro de contração isométrica de bexiga de rato. A) Estímulo com solução de KCl 40 mM. B) Adição de carbacol de forma cumulativa na ausência (esquerda) ou presença (direita) de atropina (10 nM), após incubação por 1 hora.

De modo a descartar a presença de qualquer interferente, realizou-se um controle temporal utilizando o veículo de diluição das substâncias (água ultrapura Milli Q<sup>®</sup>) (Fig. 28). O valor de  $CE_{50}$  do carbacol (0,38  $\mu$ M) não foi alterado pela adição do veículo (0,37  $\mu$ M,  $n = 3$ ). Os dados foram normalizados considerando como 100% a contração máxima obtida na primeira curva de CCh.

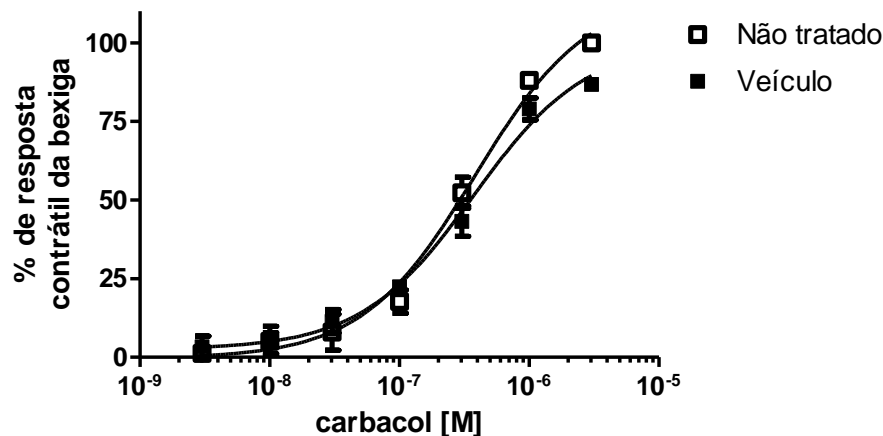


Figura 28. Curvas concentração-resposta ao carbacol em próstata de rato na ausência (□) ou presença (■) do veículo utilizado para diluição das substâncias. Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=3).

Utilizou-se o carbacol de forma cumulativa a fim de construir curvas de resposta contrátil da tira do músculo detrusor da bexiga. Tais curvas foram obtidas antes e após o tratamento com atropina (controle positivo) e LDT3, nas concentrações de 10 e 300 nM, respectivamente (Fig. 29A-B).

Na primeira curva cumulativa ao carbacol, o mesmo apresentou  $CE_{50}$  de 1,41  $\mu$ M (n = 3) (Fig. 29A). Após o tratamento com atropina 10 nM, antagonista de receptores muscarínicos, o valor de  $CE_{50}$  foi alterado para 228  $\mu$ M (n = 3). Tais valores permitiram o cálculo do valor de  $K_B$  de 0,06 nM (n = 3).

Contudo, o LDT3 mesmo na concentração de 300 nM não foi capaz de induzir um deslocamento da curva concentração-resposta ao carbacol (Fig.29B). Desta forma, não foi possível calcular o  $K_B$ . Em virtude dos resultados com o LDT3 e considerando a baixa afinidade do LDT5 aferida em ensaios de ligação para receptores muscarínicos  $M_3$ , não foram realizados esses ensaios com esta substância.

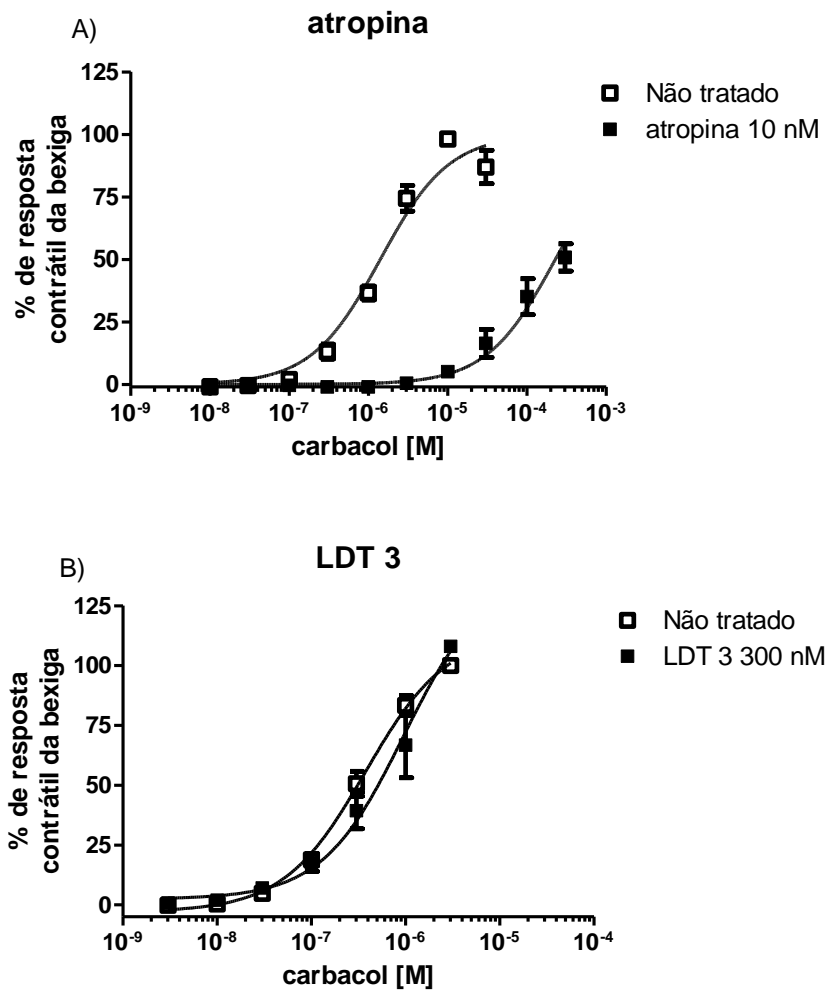


Figura 29. Curvas concentração-resposta ao carbacol em próstata de rato na ausência (□) ou presença (■) de atropina (A) ou LDT3 (B). Dados expressos como média  $\pm$  EPM de 3 (atropina) ou 7 (LDT3) experimentos individuais.



## V. Discussão

Estudos anteriores com os derivados *N*-fenilpiperazínicos LDT3, LDT5 e LDT8 demonstraram que tais substâncias apresentam perfil de alta afinidade para os AR- $\alpha_{1A/D}$  e 5-HT $_{1A}$  em detrimento de AR- $\alpha_{1B}$  e 5-HT $_{2A}$  (Tab. 5). As atividades intrínsecas em AR- $\alpha_{1A/D}$  foram determinadas, através de ensaios funcionais clássicos de órgão isolado utilizando próstata e aorta de rato, respectivamente, sendo o LDT3, LDT5 e LDT8 considerados antagonistas desses receptores (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015).

Tabela 5: Afinidade do LDT3, LDT5 e LDT8 para AR- $\alpha_{1A}$ , AR- $\alpha_{1D}$  e receptor serotoninérgico 5-HT $_{1A}$ .

LDT	AR $\alpha_{1A}$ $K_i$ (nM)	AR $\alpha_{1D}$ $K_B$ (nM)	5-HT $_{1A}$ $K_i$ (nM)	AR $\alpha_{1B}$ $K_i$ (nM)	5-HT $_{2A}$ $K_i$ (nM)
3	2,62	1,95	1,12	74	70,8
5	0,18	0,59	2,51	12	389
8	0,17	0,18	0,009	9,1	389

\*NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015

Através de ensaios de ligação utilizando o radioligante agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT $_{1A}$ , [ $^3$ H]-8-OH-DPAT, pode-se notar que o LDT3, LDT5 e LDT8 foram capazes de inibir a ligação de tal radioligante de maneira concentração-dependente, sendo considerados ligantes de alta afinidade, apresentando  $K_i$  em faixa nanomolar, destes receptores, com destaque para o LDT8, que apresentou  $K_i$  em faixa picomolar ( $K_i = 0,009$  nM). Sendo assim, o LDT8 pode ser considerado, aproximadamente, 125 vezes mais potente do que o LDT3 e 280 vezes mais potente do que o LDT5, para o receptor 5-HT $_{1A}$ . Tanto LDT3, LDT5, quanto LDT8 apresentaram maior afinidade para 5-HT $_{1A}$  do que o naftopidil, outra substância *N*-fenilpiperazínica ( $K_i = 107$ , nM; BORBE e cols., 1991), utilizado atualmente no Japão no tratamento da HPB (UKIMURA e cols., 2008).

O ensaio de competição (*binding*), *per se*, permite a quantificação da afinidade de um composto por um receptor, mas não define sua atividade intrínseca para o mesmo alvo (NOEL e cols., 2014). Desta forma, considerando o modelo do complexo ternário de GPCRs, um novo ensaio de *binding* com radioligante antagonista de receptores 5-HT $_{1A}$ , [ $^3$ H]-*p*-MPPF, na presença de GTP em alta

concentração foi realizado. Tanto LDT3, LDT5 quanto LDT8 competiram com o radioligante pelo receptor de maneira concentração-dependente, apresentando afinidade da faixa nanomolar. Porém, o LDT8 apresentou maior afinidade, seguido pelo LDT3 e LDT5. Pelo método de razão de  $K_i$  (ASSIÉ e cols, 1999), pode-se notar que LDT3 e LDT5 apresentam um valor de razão de  $K_i$  próximo a 1 (Tabela 1), podendo ser considerados como antagonistas do receptor em questão. Por sua vez, o LDT 8 apresentou valor de razão de  $K_i$  maior que 1 (66,9; Tabela 1), porém menor que o relatado para 5-HT nas mesmas condições experimentais (76,8; NOEL e cols., 2014), sugerindo, até então, atividade intrínseca de agonista pleno do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>. Contudo, em modelo de cultura de células prostáticas oriundas de pacientes com HPB, relatamos que LDT8 tem atividade agonista parcial deste receptor uma vez que estimula a proliferação celular em menor extensão que a 5-HT, porém sua pré-incubação reduziu o efeito proliferativo observado pela adição 5-HT (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015). Tal perfil de agonista não corrobora com o perfil desejado para um protótipo para o tratamento da HPB, uma vez que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> agravaria o componente estático da doença, sendo o LDT8 desconsiderado nos ensaios posteriores de avaliação farmacológica. No mesmo ensaio de proliferação celular de células prostáticas oriundas de pacientes com HPB, LDT3 e LDT5 foram capazes de inibir a proliferação induzida por 5-HT, corroborando com o perfil de antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015).

Em ensaios de ligação em preparação membranar de próstata de rato, LDT3 e LDT5 apresentaram alta afinidade para os AR- $\alpha_{1A}$ , 3,02 e 3,31 nM, respectivamente, corroborando com os dados do trabalho de NASCIMENTO (2011) em fígado de coelho (Tabela 6). Pode-se dizer, portanto, que as substâncias apresentaram afinidades semelhantes para os AR- $\alpha_{1A}$  expressos em duas espécies diferentes e que também apresentam afinidade pelos receptores prostáticos. Assim, embora a tamsulosina apresente afinidade maior por AR- $\alpha_{1A}$  prostáticos, LDT3 e LDT5 se destacam por também apresentarem alta afinidade, bloquearem a contração prostática *in vivo*, reduzirem a pressão intrauretral induzida por fenilefrina (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015) e serem antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Tabela 6: Afinidade do LDT3 e LDT5 para AR- $\alpha_{1A}$  em fígado de coelho e próstata de rato

LDT	$K_i$ (nM)	
	(fígado/coelho)*	(próstata/rato)
3	4,63	3,02
5	3,67	3,31

\*NASCIMENTO, 2011.

O receptor muscarínico  $M_3$  é expresso no trato urinário e participa do processo de contração da musculatura lisa, com destaque para o músculo detrusor da bexiga (HEGDE e cols., 1997; WHITE e cols., 2011). Pelo aumento do tamanho prostático em virtude da HPB e pela sua posição anatômica, a obstrução da uretra e, conseqüentemente, impedimento do fluxo de micção levam ao STUI (PERABO, 2012). Logo, a utilização de antagonistas muscarínicos em pacientes que apresentam retenção urinária dificulta o esvaziamento da bexiga. Desta forma, investigou-se a afinidade e atividade intrínseca do LDT3 e LDT5 por receptores muscarínicos.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, através da técnica de *binding*, mostraram que o LDT3 e LDT5 apresentam baixa afinidade pelo receptor muscarínico expresso em córtex de rato (faixa  $\mu$ M) (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015). Tal tecido é enriquecido em receptores muscarínicos do subtipo  $M_1$  (KREJCI e TUCEK, 2002; ANISUZZAMAN e cols., 2011), que não apresentam envolvimento relevante na fisiologia do trato urinário inferior. Dessa forma, fez-se necessária a avaliação das substâncias para o receptor muscarínico expresso funcionalmente na próstata e bexiga.

LDT3 e LDT5 também apresentaram baixa afinidade (faixa micromolar) por receptores muscarínicos prostáticos, através de ensaios de *binding* (Tabela 3) LDT3 apresentou afinidade aproximadamente 630 vezes menor que a apresentada pelo antagonista não seletivo, atropina (LAU & PENNEFATHER, 1998).

Pela afinidade semelhante apresentada pelo LDT3 e LDT5 tanto em receptores prostáticos ( $M_3$ ) quanto em receptores no córtex ( $M_1$ ), pode-se dizer que tais substâncias não foram capazes de distinguir entre os dois subtipos de receptor muscarínico. Ademais, pela baixa afinidade apresentada pelos receptores, LDT3 e LDT5 apresentam potencialmente menores riscos de desencadear efeitos adversos



decorrentes do antagonismo muscarínico, como boca seca, constipação intestinal, perda da acomodação visual (CHAPPLE, 2000).

Ensaio de contração de órgão isolado foram realizados em próstata e bexiga de rato, por curva cumulativa do agonista muscarínico carbacol. LDT3 apresentou atividade intrínseca de antagonista, por deslocar a curva concentração-resposta do agonista, com afinidade menor do que a atropina (Fig. 25). Tal afinidade ( $K_B = 7,81$  nM), na faixa nanomolar, é muito maior da reportada em ensaios de *binding* com a próstata utilizando radioligante muscarínico ( $[^3H]$ -QNB) ( $K_i = 6,35$   $\mu$ M). Porém, a alta afinidade assemelha-se à encontrada nos ensaios de *binding* em tecido prostático utilizando radioligante adrenérgico ( $[^3H]$ -prazosina) ( $K_i = 3,02$  nM).

GPCRs da família rodopsina podem formar homo/hetero dímeros, como já descrito para AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$ . Ademais, interações alostéricas podem ocorrer entre as duas subunidades do dímero de GPCR (PIN e cols., 2007). Visando estudar a hipótese de acoplamento/dimerização dos receptores RM<sub>3</sub> e AR- $\alpha_{1A}$  na próstata, utilizou-se a prazosina, antagonista clássico AR- $\alpha_1$ , em ensaio funcional de próstata via contração por carbacol. Estudos em próstata de rato indicam que ambos receptores compartilham a mesma via de sinalização culminando na contração da célula muscular prostática (WHITE e cols., 2013). Nesse ensaio, porém, não houve deslocamento da curva concentração-resposta de carbacol na concentração utilizada de prazosina (10 nM) (Fig. 26), o que nos levou a descartar tal hipótese.

Em ensaio de órgão isolado com bexiga de rato, o LDT3 não foi capaz de deslocar a curva concentração-resposta do carbacol até a concentração de 300 nM utilizada. Por tal concentração já ser considerada elevada para um candidato a protótipo de fármaco, não foram realizados mais estudos com maiores concentrações. Assim sendo, infere-se que o LDT3 apresenta baixa afinidade pelo receptor muscarínico em questão. Pelo fato do LDT5 ter apresentado menor afinidade pelo receptor muscarínico nos modelos estudados (*binding* e ensaio de contração com próstata de rato) quando comparado ao LDT3, optou-se por não prosseguir com o ensaio funcional em bexiga com essa substância.

Em uma sequencia de experimentos de *binding* também observamos que LDT3 e LDT8 apresentam baixa afinidade ( $K_i$  na faixa  $\mu$ M) por AR- $\alpha_2$  (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015). Desta forma, a despeito da elevada similaridade na região de reconhecimento do ligante entre receptores 5-HT<sub>1A</sub> e adrenoceptores (HILBERT e cols., 1991), as substancias apresentaram afinidades distintas.

A alta afinidade de LDT3 e LDT5 por receptores relacionados à fisiopatologia da HPB poderia contribuir para redução do componente dinâmico, ao antagonizar a contração mediada por AR- $\alpha_{1A}$ , e estático da HPB, ao inibir a proliferação celular de célula prostática mediada por receptores serotoninérgico 5-HT $_{1A}$  e AR-  $\alpha_{1D}$ , ou seja, reduzir o risco de retenção urinária e lentificar a progressão da doença, respectivamente. Mesmo em pacientes que apresentam apenas HPB assintomática, a utilização de substâncias com capacidade de inibir a proliferação celular, não atuando na via androgênica, poderia representar um retardo no aparecimento das implicações da HPB, como STUI. Isso representaria um uso profilático, porém mais estudos são necessários a fim de se considerar o uso prolongado dessas substâncias. Ademais, ambos derivados foram ativos *in vivo* e bloquearam (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , via i.v.) o efeito de aumento da pressão intrauretral induzido por fenilefrina (NASCIMENTO-VIANA e cols., 2015). Por outro lado, a baixa afinidade por receptores muscarínicos sugere que estas substâncias devem apresentar menor propensão aos efeitos adversos ocasionados por antagonismo muscarínico, considerando a relevância de tais receptores na fisiologia do trato urinário inferior, principalmente na contração do músculo detrusor.

O conjunto de dados reportados até então sugere que LDT3 e LDT5 são potenciais candidatos a novo protótipo a fármaco no tratamento da HPB.



## VI. Conclusões

---

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos LDT3 e LDT5 são antagonistas com alta afinidade pelos AR- $\alpha_{1A}$  e pelos receptores 5-HT $_{1A}$  de rato.

LDT8 apresentou-se como agonista parcial de receptores 5-HT $_{1A}$ , o que poderia agravar o componente estático da HPB.

LDT3 e LDT5 apresentaram baixa afinidade (faixa micromolar) para receptores muscarínicos (M $_3$ ), o que representaria menor risco de desencadear efeitos adversos devido ao bloqueio muscarínico.

O perfil até então apresentado por LDT3 e LDT5 inclui alta afinidade por três receptores envolvidos na proliferação celular e contração prostática durante a HPB. Desta forma, LDT3 e LDT5 podem ser considerados como candidatos a protótipo de novo fármaco multi-alvo para o tratamento da HPB.



## VII. Referências Bibliográficas

---

- ABDUL, M., ANEZINIS, P.E., LOGOTHETIS, C.J., HOOSEIN, N.M. Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. **Anticancer Res.** 14 (3A): 1215-20, 1994.
- ABRAHAMSSON, P.A., WADSTROM, L.B., ALUMETS, J., FALKMER, S., GRIMELIUS, L. Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. **Pathol. Res. Pract.** 181(6):675–683, 1986.
- ABRAMS, P., ANDERSSON, K.E., BUCCAFUSCO, J.J., CHAPPLE, C., DE GROAT, W.C., FRYER, A.D. *et al.* Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. **Br. J. Pharmacol.** 148: 565–578, 2006 (a).
- ABRAMS, P., KAPLAN, S., GANS, H.J.D.K., MILLARD, R. Safety and tolerability of Tolterodine for the treatment of overactive bladder in men with bladder outlet obstruction. **J. Urol.** 175:999-1004, 2006 (b).
- AHLQUIST, R.P. A study of the adrenotropic receptors. **Am J Physiol** 153:586–600. 1948
- AJAY, MURCKO. M.A. Computational Methods to Predict Binding Free Energy in Ligand-Receptor Complexes. **J. Med. Chem.** 38(26):4953-4967, 1995.
- AMARAL, P.A., NEVES, G., FARIAS, F., EIFLER-LIMA, V.L. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v. 39, n.4, p.351-362, 2003.
- ANDERSSON, K.E. Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. **The Lancet.** 3:46-53, 2004.
- ANDERSSON, K.E., YOSHIDA, M. Antimuscarinics and the overactive detrusor – Which is the main mechanism of action? **Eur. Urol.** 43:1-5, 2003.
- ANGLIN, I.E., GLASSMAN, D.T., KYPRIANOU, N. Induction of prostate apoptosis by  $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component. **Prost. Cancer and Pros. Diseases.** 5:88-95, 2002.
- ANISUZZAMAN, A.S.M., NISHIMUNE, A., YOSHIKI, H., UWADA, J, MURAMATSU, I. Influence os tissue integrity on pharmacological phenotypes of muscarinics acetylcholine receptores in the rat cerebral córtex. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 339:186-193, 2011.
- ASSIÉ, M.B., COSI, C., KOEK, W. Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT(1A) receptors and intrinsic activity. **Eur. J. Pharmacol.** v.386, n.1, p.97-103, 1999.
- ATTWOOD, T.K., FINDLAY, J.B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. **Protein Eng.** 7: 195–203, 1994.
- AVELLAR, M.C.W., LÁZARI, M.F.M., PORTOE, C.S. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. **An. Acad. Bras. Cienc.** 81 (3): 321-344, 2009.
- BARNES, N.M., SHARP, T. A REVIEW OF CENTRAL 5-HT RECEPTORS AND THEIR FUNCTION. **NEUROPHARMACOLOGY** 38:1083–1152, 1999.

- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Quim. Nova.** 25(6):1172-1180, 2002.
- BECHIS, S.K., OTSETOV, A.G., GE, R., OLUMI, A.F. Personalized medicine for the management of benign prostatic hyperplasia. **J. Urol.** 192:16-23, 2014.
- BORBE, O.H., METZENAUER, P., SZELENYI, I. 5-HT<sub>1A</sub>-agonistic properties of naftopidil, a novel antihypertensive drug. **Eur J Pharmacol** 205:105–107, 1991
- BORJIGIN, J., LI, X., SNYDER, S.H. THE PINEAL GLAND AND MELATONIN: MOLECULAR AND PHARMACOLOGIC REGULATION. **ANNU. REV. PHARMACOL. AND TOXICOL.** 39:53-65, 1999.
- BOURNE, H.R., ZASTROW, M.V. Receptores de Fármacos e Farmacodinâmica. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 10<sup>a</sup> ed, São Paulo. 2:17-18, 2010.
- BRADLEY, P.B., ENGEL, G., FENIUK, W., FOZARD, J.R., HUMPHREY, P.P., MIDDLEMISS, D.N., MYLECHARANE, E.J., RICHARDSON, B.P., SAXENA, P.R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacology** 25:563–576, 1986.
- BURNET, P.W., SHARP, T., LECORRE, S.M., HARRISON, P.J. Expression of 5-HT receptors and the 5-HT transporter in rat brain after electroconvulsive shock. **Neurosci Lett.** 277(2):79-82, 1999.
- BYLUND, D.B., EIKENBERG, D.C., HIEBLE, J.P., LANGER, S.Z., LEFKOWITZ, R.J., MINNEMAN, K.P., MOLINOFF, P.B., RUFFOLO, R.R.J.R., TRENDELENBURG, A.U. IV International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.** 46: 121-136, 1994.
- CALZADA, B.C., ARTIÑANO, A.A. Alpha-adrenoceptor subtypes. **Pharmacol. Res.** 44(3):195-208, 2001.
- CAULFIELD, M.P., BIRDSALL, N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. **Pharmac. Rev.** 50(2):279-390, 1998.
- CHAGAS-SILVA, F., NASCIMENTO-VIANA, J.B., ROMEIRO, L.A., NOEL, F., SILVA, C.L. Pharmacological characterization of N1-(2-methoxyphenyl)-N4-hexylpiperazine as a multi-target antagonist of  $\alpha$ 1A/ $\alpha$ 1D-adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> receptors that blocks prostate contraction and cell growth. **N-S Arch Pharmacol.** 387(3):225-34, 2014
- CHAPPLE, C.R. Muscarinic receptor antagonists in the treatment of overactive bladder. **Urology.** 55:33-46, 2000
- CHENG, Y; PRUSOFF, WH. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.** 22:3099-3108. 1973.
- CHESS-WILLIAMS, R., CHAPPLE, C.R., YAMANISHI, T., YASUDA, K., SELLERS, D.J. The minor population of M<sub>3</sub>-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. **J. Auton. Pharmacol.** 21:243-248, 2001.
- CHRIST, G.J., ANDERSSON, K.E. Rho-kinase and effects of Rho-kinase inhibition on the Lower Urinary Tract. **Neur. and Urodyn.** 26:948-954, 2007.

CHUGHTAI, B., LEE, R., TE, A.E., KAPLAN, S. Combination therapy in the management of LUTS – is this the future? **Drug Discov. Today.** 9(1):e15-e19, 2002.

COHEN, M.L., DREY, K. Contractile responses in bladder body, bladder neck and prostate from rat, guinea pig and cat. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 248(3):1063-1068, 1988.

CSERMELY P., AGOSTON V., PONGOR S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.26, n.4, p.178- 182, 2005.

CUNHA, G.R., FUJII, H., NEUBAUER, B.L., SHANNON, J.M., SAWYER, L., REESE, B.A. Epithelial-mesenchymal interactions in prostatic development. I. Morphological observations of prostatic induction by urogenital sinus mesenchyme in epithelium of the adult rodent urinary bladder. **J. Cell Biol.** 96:1662-1670, 1983.

DALE, H.H. The occurrence in ergot and action of acetylcholine. **J. Physiol.** XLVIII:iii-iv, 1914.

DE ALMEIDA, J., MENGOD, G. Serotonin<sub>1A</sub> 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.

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

DIZEYI, N., BJARTELL, A., NILSSON, E., HANSSON, J., GADALEANU, V., CROSS, N., ABRAHAMSSON, P.A. Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. **Prostate** 59 (3): 328 – 336, 2004.

DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.** 361:1-15, 1998.

DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional  $\alpha$ 1-adrenoceptors. **Cell. Mol. Life Sci.** 67:405-417, 2010.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**, New York, v.287, n.5460, p.1960-1964, 2000.

EVORA, P.R.B., PEARSON, P.J., OELTJEN, M., DISCIGIL, B., SCHAFF, H.V. Reatividade vascular da artéria mamária interna: estudos farmacológicos comparativos entre artérias caninas direita e esquerda. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** 14(4): 308-24, 1999.

FOORD, S.M., BONNER, T.I., NEUBIG, R.R., ROSSER, E.M., PIN, J.F., DAVENPORT, A.P., SPEDDING, M., HARMAR, A.J. International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. **Pharmacol. Rev.** 57: 279–288, 2005.

FRAGA, C.A.M. Razões da Atividade Biológica: Interação entre micro e biomacromolécula. **Cad. Tem. Quím. Nova Esc.** 3:33-42, 2001.

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, Paralogue Groups, and Fingerprints. **Mol. Pharmacol.** 63:1256–1272, 2003.

FUKASAWA, R., TANIGUSHI, N., MORIYAMA, N., URAY, Y., YAMAZAKI, S., UEKI, T., KAMEYAMA, S., KIMURA, K., KAWABE, K. The Alpha<sub>1L</sub>-Adrenoceptor Subtype In The



Lower Urinary Tract: A Comparison Of Human Urethra And Prostate. **Br. J. Urol.** 82: 733-737, 1998.

GADDUM, J.H., PICARELLI, Z.P. Two kinds of tryptamine receptors. **Br. J. Pharmacol.** 12: 323–328, 1957.

GIGUERE, P.M., KROEZE, W.K., ROTH, B.L. Tuning up the right signal: chemical and genetic approaches to study GPCR functions. **Cell Biol.** 27:51-55, 2014.

GRECO, K.A., MCVARY, K.T. The role of combination medical therapy in benign prostatic hyperplasia. **Int. J. Impot. Res.** 20:S33-S43, 2008.

GUIMARAES, S., MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacol Rev.** 53:319–356, 2001.

HALL, H; KÖHLER, C; GAWELL, L. Some in vitro receptor binding properties of [3H]eticlopride, a novel substituted benzamide, selective for dopamine-D2 receptors in the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.** 111:191-199. 1985.

HAMM, H.E. The many faces of G-protein signaling. **J. Biol. Chem.** 273:669-672, 1998.

HAMPEL, C., DOLBER, P.C., SMITH, M.P., SAVIC, S.L., TH ROFF, J.W., THOR, K.B., et al. Modulation of bladder alpha-1 adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. **J. Urol.** 167(3):1513-21, 2002.

HANNON, J., HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behav. Brain Res.** 195:198-213, 2008.

HAWRYLYSHYN, K.A., MICHELOTTI, G.A., COGE, F., GUENIN, S.P., SCHWINN, D.A. Update on human  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. **Trends Pharmacol Sci.** 25:449–455, 2004.

HEDGE, S.S, CHOPPIN, A., BONHAUS, D., BRIAUD, S., LOEB, M., MOY, T.M., LOURY, D., EGLIN, R.M. Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats *in vitro* and *in vivo*. **Brit. J. Pharmacol.** 120:1409-1418, 1997.

HEGDE, S.S., CHOPPIN, A., BONHAUS, D., BRIAUD, S., LOEB, M., MOY, T.M., LOURY, D., EGLIN, R.M. Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats *in vitro* and *in vivo*. **Brit. J. Pharmacol.** 120:1409-1418, 1997.

HIEBLE, J.P., Adrenoceptor subclassification: an approach to improved cardiovascular therapeutics. **Pharm. Acta. Helv.** 74(2-3):163-71, 2000.

HILBERT, M.F., TRUMPP-KALLMEYER, S., BRUINVELS, A., HOFLACK, J. Three-Dimensional Models of Neurotransmitter G-Binding Protein-Coupled Receptors. **Mol. Pharmacol.** 40:8-15, 1991.

HIRAOKA, Y; TANIGUCHI, T; TANAKA, T; OKADA, K; KANAMARU, H; MURAMATSU, I. Pharmacological characterization of unique prazosin-binding sites in human kidney. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol** 368 : 49–56. 2003.

HOELZ, L.V.B., DE FREITAS, G.B.L., TORRES, P.H.M., FERNANDES, T.V.A., ALBUQUERQUE, M.G., DA SILVA, J.F.M., PASCUTTI, P.G., DE ALENCASTRO, R.B. Receptores acoplados a proteína G. **Rev Virtual Quim.** 20(20), 2013.

HOMMA, Y., HAMADA, K., NAKAYAMA, Y., TSUJIMOTO, G., KAWABE, K. Effects of castration on contraction and alpha1-adrenoceptor expression in rat prostate. **Br. J. Pharmacol.** 131:1454-1460, 2000

HOOSEIN, N.M., LOGOTHETIS, C.J., CHUNG, L.W. Differential effects of peptide hormones bombesin, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin analog RC-160 on the invasive capacity of human prostatic carcinoma cells. **Journal of Urology.** 149, 1209-1213, 1993.

HOYER, D., HANNON, J.P., MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 71:533-554, 2002.

HSIUNG, S.C., TAMIR, H., FRANKE, T.F., LIU, K.P. Roles of extracellular signalregulated kinase and Akt signaling in coordinating nuclear transcription factorkappaB- dependent cell survival after serotonin 1A receptor activation. **J. Neurochem.** 95:1653-1666, 2005.

HULME, E.C., BIRDSALL, N.J.M., BUCKLEY, N.J. Muscarinic receptor subtypes. **Ann Rev Pharmacol Toxicol** 30:633–673, 1990.

HUMPHREY, P.P., HARTIG, P., HOYER, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 14 (6): 233-6, 1993.

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

JACOBY, E., BOUHELAL, R., GERSPACHER, M., SEUWEN, K. The 7-TM G-protein coupled receptors target family. **Chem Med Chem.** 1:760-782, 2006.

JELSKI, J., SPEAKMAN, M. Alpha adrenoceptor antagonists – have we reached the optimum balance of safety/efficacy? **Drug Discov. Today.** 9(1):e27-e33, 2012.

KENAKIN, T. Competitive antagonism, em Pharmacologic analysis of drug receptor interaction. Segunda edição. **Raven press**, Nova York. pp: 278-322, 1993.

KENAKIN, T. P. **The receptor concept, in A pharmacology primer: theory, applications, and methods.** 3rd ed., ISBN 13: 978-0-12-374585-9, 2009.

KIRBY, R., ANDERSSON, K.E., LEPOR, H., STEERS, W.D.  $\alpha$ 1-Adrenoceptor selectivity and the treatment of benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** 3:76-83, 2000.

KITAZAWA, T. Contractile Signalling Pathways in Mouse Prostate Smooth Muscle. **The Prostate.** 73:996-1006, 2013.

KOBILKA, B. K.; FRIELLE, T.; COLLINS, S.; YANG-FENG, T.; KOBILKA, T. S.; FRANCKE, U.; LEFKOWITZ, R. J.; CARON, M. G. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **Nature.** 329:358-360; 1987.

KOLAKOWSKI, L.F.J.R. GCRDB: A G-protein-coupled receptor database. **Receptors Channels.** 2:1–7, 1994.

KOJIMA, Y., SASAKI, S., SHINOURA, H., TISUJIMOTO, G., KOHRI, K. 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.

- KOJIMA, Y., SASAKI, S., HAYASHI, Y., TSUJIMOTO, G., KOHRI, K. Subtypes of  $\alpha$ 1-adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. **Nat. Clin. Pract. Urol.** 6(1):44-53, 2009.
- KOJIMA, Y., SASAKI, S., KUBOTA, Y., HAYASE, M., HAYASHI, Y., SHINOURA, H., TSUJIMOTO, G., KOHRI, K. Expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNA as a predictor of the efficacy of subtype selective alpha1-adrenoceptor antagonists in the management of benign prostatic hyperplasia. **J. Urol.** 179(3):1040-6, 2008.
- KREJCI, A., TUCEK, S. Quantitation of mRNAs for M1 to M5 Subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brains cortex. **Mol. Pharmacol.** 61:1267-72, 2002.
- KRUSE, A.C., HU, J., PAN, A.C., ARLOW, D.H., ROSENBAUM, D.M., ROSEMOND, E., GREEN, H.F., LIU, T., CHAE, P.S., DROR, R.O., SHAW, D.E., WEIS, W.I., WESS, J., KOBILKA, B. Structure and dynamics of the M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor. **Nature.** 482(7386):522-556, 2012.
- KÜMMERLE, A.E. Síntese de compostos cardioativos 1,3-benzodioxolil-Nacilidrazônicos planejados por otimização estrutural do protótipo LASSBio-294. Dissertação de mestrado, UFRJ. 2005.
- LAGERSTRÖM, M.C., SCHIÖTH, H.B. Structural diversity of G-protein coupled receptors and significance for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** 7:339-357, 2008.
- LAHTI, R.A, FIGUR, L.M., PIERCEY, M.F., RUPPEL, P.L., EVANS, D.L. Intrinsic Activity Determinations at the Dopamine D2 Guanine Nucleotide-Binding Protein- Coupled Receptor: Utilization of Receptor State Binding Affinities. **Mol. Pharmacol.**, 42(3):432-438, 1992.
- LAU, W.A.K., PENNEFATHER, J.N. Muscarinic receptor subtypes in the rat prostate gland. **Eur. J. Pharmacol.** 343:151-156. 1998
- LEPOR, H., TANG, R., KOBAYASHI, S., SHAPIRO, E., FORRAY, C., WETZEL, J.M., GLUCHOWSKI, C. Localization of the  $\alpha$ <sub>1A</sub>-adrenoceptor in the human prostate. **J.Urol.** 154:2096-2099, 1995.
- LOEB, S., KETTERMANN, A., CARTER, H.B., FERRUCCI, L., METTER, E.J., WALSH, P.C. Prostate volume changes over time: results from the Baltimore longitudinal study of aging. **J. Urol.** 182:1458-1462, 2009.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193(1):265-75, 1951.
- LU, J, PAN, W., HU, Y., WANG, Y. Multi-target drugs: The trend of drug research and development. **Plos One.** 7(6):1-6, 2012.
- 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
- LUTTRELL, D.K., LUTTRELL, L.M. Not so strange bedfellows: G-protein coupled receptors and Src family kinases. **Oncogene.** 23:7969-7978, 2004.
- MAEHLE, A. H., PRULL, C. R., HALLIWELL, R. F. The emergence of the drug-receptor theory. **Nature Rev. Drug. Disc.** 1:1637-1642, 2002.

MANJURUL ISLAM, A.H.M., KATO, H., HAYAMA, M., KOBAYASHI, S., IGAWA, Y., OTA, H., NOSHIZAWA, O. Are neuroendocrine cells responsible for the development of benign prostatic hyperplasia? **Eur. Urol.** 42:79-83, 2002.

MCCONNELL, J.D., BRUSKEWITZ, R., WALSH, P., ANDRIOLE G., LIEBER, M., HOLTGREWE, L., ALBERTSEN, P., ROEHRBORN, C.G., NICKEL, J.C., WANG, DZ., TAYLOR, A.M., WALDSTREICHER, J. The effect of finasteride on the risk of acute urinary retention and the need for surgical treatment among men with benign prostatic hyperplasia. Finasteride Long-Term Efficacy and Safety Study Group. **N. Engl. J. Med.** 338:557, 1998.

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

MCVARY, K.T., ROEHRBORN, C.G., AVINS, A.L., BARRY, M.J., BRUSKEWITZ, R.C., DONNELL, R.F., FOSTER, H.E., GONZALEZ JR., C.M., KAPLAN, S.A., PENSON, D.F., ULCHAKER, J.C., WEI, J.T. Update on AUA Guideline on the management of Benign Prostatic Hyperplasia. **J. Urol.** 185:1793-1803, 2011.

MICHEL, M.C, 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.** 121:151-157, 2010.

MICHEL, M.C., VRYDAG, W.V.  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- and  $\beta$ -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. **Br. J. Pharmacol.** 147:88–119, 2006.

MICHELOTTI, G.A., PRICE, D.T., SCHWINN, D.A. Alpha1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. **Pharmacol. Ther.** 88: 281, 2000.

MORROW, A.L.L., CREESE, I. Characterization Of A1-Adrenergic Receptor Subtypes In Rat Brain: A Reevaluation Of [3H]-WB 4101 And [3H]Prazosin Binding. **Mol. Pharmacol.** 29: 321-330, 1986.

MURAMATSU, I., OHMURA, T., KIGOSHI, S., HASHIMOTO, S., OSHITA, M. Pharmacological subclassification of alpha1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.** 99: 197-201, 1990.

MURAMATSU, I., OSHITA, M., OHMURA, T., KIGOSHI, S., AKINO, H., GOBARA, M., OKADA, K. Pharmacological characterization of alpha-1 adrenoceptor subtypes in the human prostate: functional and binding studies. **Br. J. Urol.** 74(5):572-578, 1995.

MURATA, S; TANIGUCHI, TE; 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.

NASCIMENTO, J.B. **Avaliação farmacológica de novos antagonistas duais de adrenoceptores- $\alpha$ 1 e receptores 5-HT1A: características estruturais de derivados N-fenilpiperazínicos que influenciam o parâmetro afinidade.** Dissertação de mestrado, UFRJ, 2011

NASCIMENTO-VIANA, J B, CARVALHO, A R, NASCIUTTI, L E, ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ R, CHAGAS-SILVA, F, SOUZA, P A R, ROMEIRO, L A S, GARCÍA-SÁINZ J A, NOËL, F AND SILVA, C L M. New high-affinity antagonists of  $\alpha$ 1A-/ $\alpha$ 1D.adrenoceptors and 5-HT1A receptors are potential lead compounds for multi-targeted therapy against benign prostatic hyperplasia. 2015. submetido

NASU, K., MORIYAMA, N., KAWABE, K., TSUJIMOTO, G., MURAI, M., TANAKA, T., YANO, J. Quantification and distribution of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. **Br. J. Pharmacol.** 119:797-803, 1996.

NEVES, G., MENEGATTI, R., ANTONIO, C.B., GRAZZIOTTIN, L.R., VIEIRA, R.O., RATES, S.M., NOËL, F., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A. Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. **Bioorg. Med. Chem.** 18(5):1925-35, 2010.

NISHIMUNE, A., YOSHIKI, H., UWADA, J., ANISUZZAMAN, A.S.M., UMADA, H., MURAMATSU, I. Phenotype pharmacology of lower urinary tract  $\alpha$ 1-adrenoceptors. **Br. J. Pharmacol.** 165:1226-1234, 2012.

NOEL, F., POMPEU, T.E.T., MOURA, B.C. Functional binding assays for estimation of the intrinsic efficacy of ligands at the 5-HT1A receptor: application for screening drug candidates. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.** 70:12-18, 2014.

OHMURA, T., MURAMATSU, I. Two distinct  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in rabbit liver: a binding study. **Br. J. Pharmacol.** 116: 2591-2596, 1995.

OLDHAMM, W.M., HAMM, H.E., Heterotrimeric G protein activation by G-protein –coupled receptors. **Nature.** 9:60-71, 2008.

PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C.A., MOTOSHIMA, H., FOX, B.A., LE TRONG, I., TELLER, D.C., OKADA, T., STENKAMP, R.E., YAMAMOTO, M., MIYANO, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. **Science.** 289 (5480): 739 – 45, 2000.

PERABO, F.G.E. Drug development for LUTS – The challenge for industry. **Drug Discov Today.** 9(1):e5-e14, 2012.

PEROUTKA S.J. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT1C binding sites in rat frontal cortex. **J. Neurochem.** 47:529-540, 1986.

PEROUTKA, S. J.; SCHMIDT, A. W.; SLEIGHT, A. J.; HARRINGTON, M. A. Serotonin receptor "families" in the central nervous system. **Ann. NY Acad. Sci.** 600:104-113; 1990.

PEROUTKA, S.J., SNYDER, S.H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]-5-hydroxytryptamine, [3H]-lysergic acid diethylamide and [3H]-spiroperidol. **Mol. Pharmacol.** 16:687–699, 1979.

PIN, J-P., NEUBIG, R., BOUVIER, M., DEVI, L., FILIZOLA, M., JAVITCH, J.A., LOHSE, M.J., MILLIGAN, G., PALCZEWSKI, K., PARMENTIER, M., SPEDDING, M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the Recognition and Nomenclature of G Protein-Coupled Receptor Heteromultimers. **Pharmacol. Rev.** 59:5–13, 2007.

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

RIZZO, S., BISI, A., BARTOLINI, M., MANCINI, F., BELLUTI, F., GOBBI, S., ANDRISANO, V., RAMPA, A. Multi-target strategy to address Alzheimer's disease: design, synthesis and biological evaluation of new tacrine-based dimers. **Eur. J. Med. Chem.** 46:4336-4343, 2011.

ROBERTSON, M.J., LUMLEY, P. Effects of hypoxia, elevated K<sup>+</sup> and acidosis on the potency of verapamil, diltiazem and nifedipine in the guinea-pig isolated papillary muscle. **Br. J. Pharmacol.** 98:937-949, 1989.

ROEHRBORN, C.G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. **Int. J. Impot. Res.** 20:S11-S18, 2008.

ROEHRNORN, C.G., BOYLE, P., NICKEL, C., HOEFNER, K., ANDRIOLE, G. Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with Benign Prostatic Hyperplasia. **Urology.** 60:3, 2002.

ROMEIRO, L.A., DA SILVA FERREIRA, M., DA SILVA, L.L., CASTRO, H.C., MIRANDA, A.L., SILVA, C.L., NOËL, F., NASCIMENTO, J.B., ARAÚJO, C.V., TIBIRIÇA, E., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A. 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(7):3000-3012, 2011.

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.

SAXENA, P.R. Serotonin receptors: Subtypes, functional responses and therapeutic relevance. **Pharmac. Ther.** 66:339-368, 1995.

SCHNEIDER, T., HEIN, P., MICHEL, M.C. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca<sup>2+</sup> sources. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 308:47-53, 2004.

SCOFIELD, M.A., LIU, F., ABEL, P.W., JEFFRIES, W.B. Quantification of the steady state expression of mRNA for alpha1-adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 275: 1035-1042, 1995.

SHINKA, T., ONODERA, D., TANAKA, T., SHOJI, N., MIYAZAKI, T., MORIUCHI, T., FUKUMOTO, T. Serotonin synthesis and metabolism-related molecules in a human prostate cancer cell line. **Onc Lett.** 2:211-215, 2011.

SJOERDSMA, A.; PALFREYMAN, M.G. History of serotonin and serotonin disorders. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 600:1-8, 1990.

TAUTERMANN, C.S. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. **Bioorg. Med. Chem. Letters** 24:4073-4079, 2014.

TRUMPP-KALLMEYER, S., HOFLACK, J., BRUINVELS, A., HIBERT, M. Modeling of G-Protein-Coupled Receptors: Application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. **J. Med. Chem.** 35:3448-3462, 1992.

UKIMURA, O., KANAZAWA, M., FUJIHARA, A., KAMOI, K., OKIHARA, K., MIKI, T. Naftopidil versus tamsulosin hydrochloride for lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia with special reference to the storage symptom: A prospective randomized controlled study. **Int. J. Urol.** 15:1049-54, 2008.

VENKATAKRISHNAN, A.J., DEUPI, X., LEBON, G., TATE, C.G., SCHERTLER, G.F., BABU, M.M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 494:185-194, 2013.

VILLALÓN, C.M., CENTURIÓN, D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and

- therapeutic implications. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 376 (1-2): 45-63, 2007.
- WALDEN, P.D., GERARDI, C., LEPOR, H. Localization and expression of the  $\alpha_{1A1}$ ,  $\alpha_{1B}$ , and  $\alpha_{1D}$  adrenoceptors in Hyperplastic and non-hyperplastic human prostate. **J. Urol.** 161:635-640, 1999.
- WALL, M.A., COLEMAN, D.E., LEE, E., IÑIGUEZ-LLUHI, J.A., POSNER, B.A., GILMAN, A.G., SPRANG, S.R. The structure of the G protein heterotrimer  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ . **Cell.** 83(6):1047-1058, 1995.
- WANG, Y., LI, Y., SHI, G. The regulating function of heterotrimeric G proteins in the immune system. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** 61:309-319, 2013.
- WESS, J., EGLIN, R.M., GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nat. Rev. Drug Discov.** 6: 721–733, 2007.
- WHITE, C.W., SHORT, J.L., HAYNES, J.M., MATSUI, M., VENTURA, S. Contractions of the mouse prostate elicited by acetylcholine are mediated by M3 muscarinic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 339:870-877, 2011.
- WHITE, C.W., SHORT, J.L., VENTURA, S. Rho kinase activation mediates adrenergic and cholinergic smooth muscle contractile responses in the mouse prostate gland. **Eur. J. Pharmacol.** 721(1-3):313-321, 2013.
- YAMADA, S., ITO, Y., TSUKADA, H.  $\alpha_1$ -Adrenoceptors and muscarinic receptors in voiding function – binding characteristics of therapeutic agents in relation to the pharmacokinetics. **Br J Clin Pharmacol.** 72(2):205-217, 2011.
- YAZAWA, H., HONDA, K. The M3-Muscarinic Cholinoreceptor Subtype in Rat Prostate and Its Down Regulating by Aging. **Jap. J. Pharmacol.** 61:319-324, 1993.