

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**JESSICA BARBOSA DO NASCIMENTO VIANA**

**LDT3 E LDT5, ANTAGONISTAS MULTI-ALVO DE  
ADRENOCEPTORES  $\alpha_{1A/1D}$  E RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>  
INIBEM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS PROSTÁTICAS  
HIPERPLÁSICAS HUMANAS, A CONTRAÇÃO  
PROSTÁTICA E O AUMENTO DE PRESSÃO  
INTRAURETRAL**

RIO DE JANEIRO

OUTUBRO, 2015

**LDT3 E LDT5, ANTAGONISTAS MULTI-ALVO DE ADRENOCEPTORES  $\alpha_{1A/1D}$  E  
RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> INIBEM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS PROSTÁTICAS  
HIPERPLÁSICAS HUMANAS, A CONTRAÇÃO PROSTÁTICA E O AUMENTO DE PRESSÃO  
INTRAURETRAL**

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

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

Rio de Janeiro  
Outubro/2015

Nascimento-Viana, Jessica Barbosa

LDT3 e LDT5, antagonistas multi-alvo de adrenoceptores  $\alpha_{1A/1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub> inibem a proliferação de células prostáticas hiperplásicas humanas, a contração prostática e o aumento de pressão intrauretral / Jessica Barbosa do Nascimento Viana -- Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2015.  
xxvii, 145f.:il.

Orientadores: Cláudia Lúcia Martins da Silva e François Germain

Noël

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2015.

Referências Bibliográficas: f. 115-145.

1. receptor metabotrópico 2. antagonistas 3. adrenoceptor. 4. receptor 5-HT<sub>1A</sub>. 5. fenilpiperazinas. I. Silva, Cláudia Lúcia Martins (Orient.) e Noël, François Germain (Coorient.) II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

“LDT3 e LDT5, antagonistas multi-alvo de adrenoceptores  $\alpha$ 1A/1D e receptores 5-HT1A inibem a proliferação de células prostáticas hiperplásicas humanas, a contração prostática e o aumento da pressão intrauretral.”

## **Jessica Barbosa Nascimento Viana**

### **Orientadores:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Lucia Martins da Silva**

**Prof. Dr. François Germain Noel**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Farmacologia e Química Medicinal).

Aprovada por:

  
Prof. Dr. André Sampaio Pupo

  
Prof. Dr. Claudia dos Santos Mermelstein

  
Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilda Angela Neves (revisora)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Lucia Martins da Silva (orientadora)

Rio de Janeiro  
13 de outubro de 2015

*Dedico este trabalho*

*Á minha família, Marconi e Carolina.*

*Carolina, meu presentinho micro que mudou todo o meu mundo macro. Essa florzinha que se desenvolve dentro de mim e me dará o melhor título que poderia desejar.*

*Amor da minha vida, obrigada por tudo.*

*Florzinha da mamãe, você ainda nem chegou e eu já te amo tanto. Escrever essa tese embalada pelos seus chutinhos na minha barriga foi simplesmente maravilhoso.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professores CLÁUDIA LÚCIA MARTINS DA SILVA e FRANÇOIS GERMAIN NOËL, por serem mais que tutores, por se tornarem exemplos a se seguir. Agradeço todos os ensinamentos, conselhos, sorrisos e amizade. Muito obrigada por alimentarem ainda mais o amor que eu sempre tive pela ciência.

Ao professor DR. LUIS EDUARDO M. QUINTAS agradeço cada sugestão e ensinamento. Suas contribuições sempre foram de grande valia.

Agradeço às colaborações do professor DR. LUIS ANTONIO SOARES ROMEIRO (disponibilização das substâncias do presente estudo), professor DR. LUIZ EURICO NASCIUTTI, DR. PEDRO SOUZA e MSC. ELIANE GÔUVEA (concessão das células de HPB e ensaios de microscopia confocal). Obrigada por cada conversa tão enriquecedora, excelentes discussões e sugestões na realização e continuidade deste projeto.

Às pessoas que fizeram o dia-a-dia de trabalho mais agradável, feliz e produtivo, aos amigos e colegas do laboratório que carinhosamente denomino como “FAMÍLIA LFBM”. Em especial agradeço à, hoje mestre, ALINE REIS DE CARVALHO, minha eterna aluna de IC. Obrigada por me mostrar o prazer de ensinar e pelas trocas de conhecimento. À todos, muito obrigada por cada conversa, ajuda, conselho, impulso e, claro, por cada festinha! Pode deixar continuarei fazendo o nosso brigadeiro com morango!

Aos técnicos do laboratório ORLANDO R. MOREIRA e JOSÉ F. OLIVEIRA pela contribuição indispensável na realização deste trabalho.

Ao professor ANDRÉ SAMPAIO PUPO, por todo conhecimento compartilhado ao longos desses anos e pela ajuda e incentivo para a realização do meu Doutorado Sanduíche na UNAM. Suas contribuições foram fundamentais.

*A mis queridos DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA-SAINZ, ROCÍO ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ, y todos los CHILANGOS de mi vida, muchas gracias por todo el tiempo que*

*estuve en mi “México Lindo y Querido”. Sus contribuciones científicas, las enseñanzas en el laboratorio, los partidos de fútbol en el Mundial (durante los experimentos) y las risas. Todo se guardarán para siempre en mi memoria y corazón. Todas las classes a cerca de “la agua de las verdes matas” , los taquitos, tamales, guacamole y chile, me hicieron la brasileña más chilanga.*

Aos professores GILDA ÂNGELA NEVES, CLAUDIA DOS SANTOS MERMELSTEIN, ANDRÉ SAMPAIO PUPO e MARCO AURÉLIO MARTINS, pela avaliação deste trabalho e pelas contribuições que hão de fazer.

Ao grande e eterno amor da minha vida, MARCONI. Quem diria que aquelas aulas de física no pré-vestibular culminariam nessa história de amor que escrevemos juntos? Entre cadernos, livros, descobertas, viagens, muitos prazeres, alegrias e alguns espinhos, escrevemos cada capítulo com muita intensidade, e hoje estamos a um passo de escrever a parte mais desejada e aguardada dessa história. Aguardamos a chegada da maior alegria da nossa vida. Nosso mais lindo projeto, nossa Carolina! Obrigada por me ajudar a realizar todos os meus sonhos, acadêmicos e pessoais. Obrigada por me permitir sonhar, por sentir a maior saudade que jamais poderíamos imaginar e ainda assim me incentivar. Paraphraseando Frida Kahlo: “*Pies, ¿para qué los quiero si tengo alas para volar?*” Meu amor, você me deu asas. Eu te amo!

À minha família, pela base sólida e por não me deixar sequer pensar em desanimar (né, MÃE?!). Esse amor é eterno! MÃE, PAI, JR., DIOGO, DUDA e GIGI, meu maior agradecimento é à Deus por me ter me dado vocês. Amo demais!

Aos meus queridos amigos, que sempre me apoiaram. Vocês estão presentes das alegrias da vida até os estresses pré-tese (com direito a busca por artigos (quase impossíveis), desenho de estruturas de moléculas e discussão de resultados). CAMBADA, BIOPATOTA e AMIGOS DE INFÂNCIA alguma porcentagem desse título é de vocês!!

Ao CNPq, FAPERJ, CAPES e PDSE-CAPES pelo suporte financeiro. E à *BIOZEUS* (Desenvolvimento de Produtos Biofarmacêuticos S.A.) pelo custeio dos ensaios SafetyScreen 44, realizado pela *Eurofins CEREP*.

## RESUMO

NASCIMENTO-VIANA, JESSICA BARBOSA. **LDT3 e LDT5, antagonistas multi-alvo de adrenoceptores  $\alpha_{1A/1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub> inibem a proliferação de células prostáticas hiperplásicas humanas, a contração prostática e o aumento de pressão intrauretral.** Rio de Janeiro, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é caracterizada pela proliferação de células estromais prostáticas e a contração do músculo liso periuretral, ocasionando os sintomas do trato urinário inferior. Ainda que não alcançado o ideal no balanço entre eficácia e segurança, o tratamento atual da HPB se baseia em monoterapia com antagonistas de adrenoceptores (AR)  $\alpha_{1A}$ , contendo os eventos contráteis da doença. Relatos recentes sugerem que a estimulação de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub> (serotonina) contribuem para a proliferação celular em tecido prostático. Desta forma, fármacos que antagonizem esses receptores poderiam conter a progressão da doença. Neste trabalho avaliou-se o potencial derivados *N*-fenilpiperazínicos - LDT3, LDT5 e LDT8 - antagonistas multi-alvo de receptores associados à HPB, estimando: a afinidade e eficácia em ensaios de contração isométrica e de ligação (*binding*) utilizando tecidos (próstata e aorta) e preparações de membrana cerebral enriquecidas em receptores específicos, alvo ou não; a potência dos LDTs em ensaios de medidas de  $Ca^{2+}$  intracelular, utilizando células que super-expressam os subtipos de AR- $\alpha_1$  humanos; o efeito anti-proliferativo em células prostáticas (DU-145 e células de pacientes portadores de HPB); e, efeitos sobre pressão intrauretral e arterial de ratos. LDT3 e LDT5 são antagonistas potentes de AR  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub> (valores de  $K_i$  na faixa nanomolar) e inibem completamente a proliferação de células prostáticas induzida por fenilefrina e serotonina. Ao mesmo tempo, que o LDT5 é capaz de bloquear totalmente o aumento da pressão intra-uretral induzida por fenilefrina ( $DE_{50}$  de 0,09  $\mu$ g/kg) e, nas mesmas doses, não apresenta nenhum efeito sobre a pressão arterial média basal. LDT3 e LDT5 são antagonistas multi-alvo dos principais receptores envolvidos na HPB, e são capazes de desencadear o relaxamento da musculatura prostática além de inibir o crescimento de células de próstata humana *in vitro*. Assim, LDT3 e LDT5 representam potenciais novos candidatos à fármacos para o tratamento de HPB.

## ABSTRACT

**NASCIMENTO-VIANA, JESSICA BARBOSA. LDT3 and LDT5, multi-target antagonists of adrenoceptor  $\alpha_{1A/1D}$  and 5-HT<sub>1A</sub> receptors, inhibits the proliferation of human prostatic hyperplastic cells, prostatic contraction and the increase in intraurethral pressure.** Rio de Janeiro, 2015. Tese (Doutorado Em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is characterized by stromal cell proliferation and contraction of the periurethral smooth muscle, causing lower urinary tract symptoms. Current BPH treatment, based on monotherapy with  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonists, is frequently suboptimal, and recent reports suggest that stimulation of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> (serotonin) receptors also contributes to cell proliferation. Here, we investigated the potential of three *N*-phenylpiperazine derivatives - LDT3, LDT5 and LDT8 - as multi-target antagonists of BPH-associated receptors. The affinity and efficacy of LDTs were estimated in isometric contraction and competition binding assays using tissues (prostate and aorta) and brain membrane samples enriched in specific on- or off-target receptors. LDT potency was estimated in intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation assays using cells overexpressing human  $\alpha_1$ -adrenoceptors subtypes. The anti-proliferative effect of LDTs on prostate cells (DU-145 and cells from BPH patients) was evaluated by viable cell counting and MTT assays. We also determined LDT effects on rat intraurethral and arterial pressure. LDT3 and LDT5 are potent antagonists of  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> receptors ( $K_i$  values in the nanomolar range), and fully inhibited phenylephrine- and 5-HT-induced proliferation of BPH cells. Also, LDT5 fully blocked the increase of intraurethral pressure induced by phenylephrine showing a ED<sub>50</sub> of 0.09  $\mu$ g/kg, these doses had no effect on basal blood pressure. In summary, LDT3 and LDT5 are multi-target antagonists of key receptors for BPH, and are able of triggering both prostate muscle relaxation and human hyperplastic prostate cell growth inhibition *in vitro*. Thus, LDT3 and LDT5 represent potential new lead compounds for BPH treatment.

## ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina ou serotonina
<b>AR</b>	Adrenoceptor
<b>AUA</b>	Associação Americana de Urologia (do inglês <i>American Urological Association</i> )
<b>BCRJ/UFRJ</b>	Banco de células do Rio de Janeiro
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina (do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> ")
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentração de Cálcio intracelular
<b>CaMK II</b>	Proteína Cinase Dependente de Cálcio/calmodulina),
<b>CE<sub>50</sub></b>	concentração que promove 50% do efeito máximo
<b>CLM</b>	Cadeia leve da miosina
<b>CI<sub>50</sub></b>	concentração que promove 50% da inibição máxima
<b>CPM</b>	Contagem Por Minuto
<b>CR</b>	razão de concentração que promove 50% do efeito máximo (do inglês " <i>Concentration ratio</i> ")
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DHT</b>	Di-hidrotestosterona
<b>DNA</b>	Ácido deoxiribonucleico (do inglês " <i>Deoxyribonucleic acid</i> ")
<b>DMEM</b>	Meio de cultura de células ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>ECL</b>	Eletro <i>químico</i> -luminiscência (do inglês " <i>Electrochemiluminescence</i> ")
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal (do inglês " <i>Epidermal growth factor</i> ")
<b>EGFR</b>	Receptor de fatores de crescimento epidermal (do inglês " <i>Epidermal growth factor receptor</i> ")
<b>EGTA</b>	Ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetracético
<b>EL</b>	Eficiência do Ligante
<b>E<sub>max</sub></b>	Efeito máximo
<b>EPM</b>	Erro padrão da média

<b>ERK</b>	Proteína cinase ativada por sinais extracelulares (do inglês “ <i>extracellular signal-regulated kinase</i> ”)
<b>FE</b>	Fenilefrina
<b>FDA</b>	do inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
<b>FT-IR</b>	Espectros de infra-vermelho por transformada de Fourier
<b>g</b>	força gravitacional
<b>GMP</b>	Monofosfato de guanosina (do inglês “ <i>guanosine monophosphate</i> ”)
<b>GPCR</b>	receptores acoplados à proteína G (do inglês “ <i>G-protein coupled receptors</i> ”)
<b>GRAFS</b>	Classificação de GPCR - <b>G</b> - Família glutamato; <b>R</b> - Família rodopsina; <b>A</b> - Família de receptores de adesão; <b>F</b> - Família Frizzled; <b>S</b> - Família da Secretina
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina (do inglês “ <i>guanosine triphosphate</i> ”)
<b>HB-EGF</b>	Fator de crescimento tipo EGF ligado à heparina (do inglês “ <i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i> ”)
<b>HEPES</b>	4-(2-Hidroxietil)piperazine-1-ácido etanosulfônico
<b>HPB</b>	Hiperplasia Prostática Benigna
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trisfosfato
<b>IPSS</b>	índice internacional de sintomas prostáticos (do inglês “ <i>International Prostatic Symptoms Score</i> ”)
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>IUPHAR</b>	União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (do inglês “ <i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i> ”)
<b>i.v.</b>	Via intra venosa
<b>K<sub>B</sub></b>	constante de equilíbrio de dissociação de um antagonista determinada por meio de um ensaio funcional
<b>K<sub>d</sub></b>	constante de equilíbrio de dissociação de um ligante determinada diretamente em um ensaio de ligação
<b>K<sub>i</sub></b>	constante de equilíbrio de dissociação de um ligante determinado em estudos de competição

<b>LADETER</b>	Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
<b>LUTS</b>	Sintomas do trato urinário inferior (do inglês " <i>Lower Urinary Tract Symptoms</i> ")
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês " <i>mitogen activated protein kinase</i> ")
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>NE</b>	Neuroendócrina
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino (do inglês " <i>phosphate buffered saline</i> ")
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
<b>PIU</b>	Pressão intra-uretral
<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>POPOP</b>	1,4-Bis(5-feniloxazol-2-il)benzene
<b>PPO</b>	2,5-Difeniloxazol
<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico (do inglês " <i>Prostate Specific Antigen</i> ")
<b>PZS</b>	Prazosina
<b>RIPA</b>	Tampão de lise e solubilização celular (do inglês " <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i> ")
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês " <i>Messenger Ribonucleic acid</i> ")
<b>RO5</b>	Regra dos 5 de Lipinski (do inglês " <i>Rule Of 5</i> ")
<b>RPMI</b>	Meio de cultura de células (" <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ")
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio (do inglês " <i>sodium dodecyl sulfate</i> ")
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SNA</b>	Sistema Nervoso Autônomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TM</b>	Transmembranar

**Tris**

Tris-(hidroximetil)aminometano

## FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração da anatomia do sistema reprodutor e urinário masculino mostrando, em destaque, a próstata entre outros órgãos. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0025017/?figure=1> ..... 4
- Figura 2.** Diagrama esquemático das zonas prostáticas humana. Adaptado a partir de MYERS e cols., 2010 ..... 5
- Figura 3.** Ilustração do epitélio prostático, mostrando as diferentes células que o compõem. Modificado de BOK & SMALL, 2002..... 6
- Figura 4.** Ilustração da próstata normal e hiperplásica (Modificada de ©ReedGroup - <http://www.mdguidelines.com/prostatic-hyperplasia>) ..... 8
- Figura 5.** Questionário que avalia sintomas associados à HPB. IPSS (do inglês, “International Prostatic Symptoms Score”) Adaptado a partir de <http://www.urospec.com/uro/Forms/ipss.pdf> ..... 10
- Figura 6.** Organograma para a decisão da conduta a ser tomada para o tratamento da HPB. IPSS (do inglês, “International Prostatic Symptoms Score”) resultado de questionário que avalia sintomas associados à HPB. PSA: Antígeno Prostático específico (do inglês “Prostate Specific Antigen”) Adaptado a partir de MARBERGER e cols., 2012..... 12
- Figura 7.** Esquema da transativação de EGFR induzida por GPCR – Modificado de LAPPANO & MAGGIOLINI, 2011. Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) induzem a transativação de receptores de fatores de crescimento epidermal (EGFR). Tal transativação pode envolver vários mediadores, tais como proteínas quinases não-receptoras (SRC), cálcio intracelular ( $Ca^{+2}$ ), a proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA). Estes mediadores ativam metaloproteinases de matriz (MMP) que vão clivar pro-HB-EGF, liberando o fator de crescimento epidérmico ligado a heparina

(HB-EGF) que irá ativar os EGFR. Este receptor, por meio da via das MAPK, vai induzir a proliferação celular. .... 19

**Figura 8.** Pontos farmacofóricos e características de conformacionais (**A** – Nitrogênio básico; **B** - Anel aromático (ponto de interações hidrofóbicas); **C** – espaçador) da subunidade *N*-fenilpiperazina, e suas semelhanças com os neurotransmissores serotonina, dopamina e adrenalina. Adaptado a partir de MAIA e cols., 2012 ..... 23

**Figura 9.** Parte superior: Estruturas da *N*-fenilpiperazina e BMY7378; Parte inferior: (**A**) Núcleo *N*-fenilpiperazínico dos LDTs. R1 e R2 representam substituintes no N<sub>4</sub> da piperazina e na posição 2 do anel aromático, respectivamente. (**B**) Estrutura química do LASSBio-772 (ROMEIRO e cols., 2011). A unidade farmacofórica *N*-fenilpiperazínica é identificada pela seta vermelha, e a unidade farmacofórica arílica é indicada pela seta azul. .... 24

**Figura 10.** Estruturas moleculares dos LDT3, LDT5 e LDT8 (PCT/BR2013/00003)..... 25

**Figura 11.** Representação esquemática do sistema de órgão isolado onde realizou-se ensaios funcionais com próstata de rato (modificado de EVORA e cols., 1999)..... 36

**Figura 12.** Curva concentração-resposta teórica do agonista na ausência (linha contínua) e presença do antagonista superável (linha pontilhada) ..... 38

**Figura 13.** Curva teórica de saturação ..... 39

**Figura 14.** Curva teórica de competição ..... 40

**Figura 15.** Organograma de preparação membranar de córtex de rato (AR- $\alpha_{2A}$ )..... 42

<b>Figura 16.</b> Organograma de preparação membranar de estriado de rato (receptores D <sub>2</sub> -“like”) .....	46
<b>Figura 17.</b> Organograma de preparação membranar de hipocampo de rato (receptores 5-HT <sub>1A</sub> ) .....	48
<b>Figura 18.</b> Esquema do protocolo para análise dos efeitos dos LDTs sobre comportamento e temperatura corporal .....	52
<b>Figura 19.</b> Representação esquemática do acoplamento do transdutor de pressão ao interior da uretra prostática de ratos Wistar machos para realização dos ensaios de pressão intra-uretral .....	55
<b>Figura 20.</b> Esquema dos ensaios de medida de pressão intra-uretral (PIU).....	55
<b>Figura 21.</b> Esquema dos ensaios de medida de pressão intra-uretral (PIU) – Curva dose-resposta para LDT5 e tansulosina.....	56
<b>Figura 22.</b> Esquema dos ensaios de medição da pressão arterial média (PAM).....	57
<b>Figura 23.</b> Esquema de cultivo e tratamento das células DU-145 e HPB para ensaio de proliferação celular (MTT).....	59
<b>Figura 24.</b> Esquema de cultivo e tratamento das células DU-145 e HPB para ensaio de viabilidade por exclusão com azul de Trypan .....	60
<b>Figura 25.</b> Efeito da pré-incubação (1h) dos LDTs sobre a contração induzida pela fenilefrina em próstata de rato. Os dados estão expressos como médias ± EPM de 6-9 experimentos utilizando amostras de tecidos de diferentes animais .....	67

**Figura 26.** Avaliação da potência dos LDT3, LDT5 e LDT8 em adrenoreceptores  $\alpha_{2A}$  (A), receptores muscarínicos(B) e receptores D<sub>2</sub>-like (C). Inibição da ligação específica de [<sup>3</sup>H]-RX821002 (1 nM, A), [<sup>3</sup>H]-QNB (0,1 nM, B) e [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (0,1 nM, C) pelos derivados LDT3, LDT5 e LDT8. As figuras representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos individuais realizados em triplicata. .... 69

**Figura 27.** Ligação específica da [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (1 nM) (símbolos fechados) e [<sup>3</sup>H]-p-MPPF (0,5 nM) (símbolos abertos) em membranas de hipocampo de rato na presença de concentrações crescentes dos derivados (A) LDT3, (B) LDT5 e (C) LDT8. Dados expressos como média  $\pm$  EPM de 2-6 experimentos individuais realizados em triplicata. .... 72

**Figura 28.** Traçados típicos do ensaio de aumento de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células Rat-1 expressando AR- $\alpha_{1A}$  (A), AR- $\alpha_{1B}$  (B) ou AR- $\alpha_{1D}$  (C). FE=fenilefrina. .... 74

**Figura 29.** Efeito da pré-incubação do LDT3 sobre a elevação dos níveis de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mediada por fenilefrina (100  $\mu$ M) em fibroblastos Rat-1 transfectados com o receptor humano AR- $\alpha_{1D}$ . O aumento na ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induzida por 100  $\mu$ M de fenilefrina (A; tratados com veículo) foi atenuado por pré-tratamento com 10 e 100 nM LDT3 (B e C, respectivamente)..... 76

**Figura 30.** Curva de concentração-resposta para o efeito de fenilefrina frente a pré-incubação do LDT3, LDT5 ou controles (tansulosina para fibroblastos Rat-1 transfectados com o receptor humano AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1B}$ ; ou BMY7378 para fibroblastos Rat-1 transfectados com o receptor humano AR- $\alpha_{1D}$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. n = 3-6..... 77

**Figura 31.** Investigação do efeito dos LDTs sobre a temperatura corporal de camundongos. A temperatura foi medida imediatamente antes ou após 30 e 60 minutos da administração de LDT3 e LDT5 (n=6) por via intraperitoneal em dose única (100  $\mu$ g/kg). O grupo controle recebeu somente o veículo de

administração (solução salina). Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido de teste post hoc de Dunnett ..... 78

**Figura 32.** Curva de dose - resposta para o efeito de fenilefrina sobre a pressão intra-uretral (PIU) de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM n = 7-8 ..... 80

**Figura 33.** Efeito do pré-tratamento com LDT3, LDT5 ou tansulosina sobre o aumento de pressão intra-uretral (PIU) de rato induzida por fenilefrina (FE). Efeito da FE (30 ug/kg) na ausência (barra branca) ou na presença de pré-tratamento com uma dose única de LDT3 ou LDT5 (0,1  $\mu$ g/kg, iv) (barras hachuradas azuis e laranjas, respectivamente) ou tansulosina (0,01  $\mu$ g/kg, iv) (barras cinzas hachuradas). Os dados são expressos como média e EPM ( n = 3-4). \*\*\* P < 0,001 (tratamentos com LDTs e tansulosina vs. FE), \*\* P < 0,01 (LDT5 vs. LDT3) (ANOVA seguido por teste post-hoc de Dunnett) ..... 81

**Figura 34.** Curvas dose-resposta ao LDT5 e tansulosina sobre o aumento da pressão intra-uretral (PIU) de ratos induzido por fenilefrina (FE, 30  $\mu$ g/kg). Os dados são expressos como percentual (%) de inibição (média  $\pm$  SEM, n = 3-8 replicatas)..... 82

**Figura 35.** Variação de pressão arterial média em ratos após administração intravenosa em bolus de antagonistas AR- $\alpha$ 1: Tansulosina (0,01 ug/kg), LDT3 ou LDT5 (0,1 ug/kg), ou veículo (salina). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da variação em porcentagem em relação ao valor basal (pré-tratamento). Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos (P > 0,05, ANOVA fator único). ..... 83

**Figura 36.** Variação da pressão arterial média em ratos após a administração de diferentes doses, por via intravenosa em bolus, de: LDT5 (A) ou tansulosina (B). (C) Variação da pressão arterial média representada em curva dose-resposta. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. da variação percentual em relação ao valor de base (pré-tratamento) (n = 3-6). \*\*\* P <

0,001 contra solução salina, ANOVA fator único seguida do teste post - hoc de Dunnett..... 84

**Figura 37.** Inibição do crescimento de células DU-145 por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de MTT. BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT $_{1A}$ , respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 5-12 experimentos independentes realizados em quintuplicata. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett). Os valores são expressos em % do controle (basal) ..... 86

**Figura 38.** Inibição do crescimento de células DU-145 por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina (FE) 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de exclusão do Azul de Trypan. BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT $_{1A}$ , respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 2-5 experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett) ..... 87

**Figura 39.** Inibição do crescimento de células oriundas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de MTT. BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT $_{1A}$ , respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 5-12 experimentos independentes realizados em quintuplicata. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett)..... 89

**Figura 40.** Inibição do crescimento de células oriundas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) por LDT3 e LDT5. O crescimento

celular foi induzido por fenilefrina 3  $\mu\text{M}$  (A) ou 5-HT 1  $\mu\text{M}$  (B) e avaliado pelo ensaio de exclusão do Azul de Trypan. BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT $_{1A}$ , respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 3-7 experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett)..... 90

**Figura 41.** Micrografia das células estromais de hiperplasia prostática benigna. Marcações: Vermelho - faloidina (filamentos de actina); Azul - DAPI (marcador de proteína nuclear); Verde - Ki-67 (marcador de proliferação celular). Inibição da proliferação celular, induzida por via adrenérgica (Fenilefrina (FE) 3  $\mu\text{M}$ ), em células de pacientes portadores de HPB, por BMY7378, LDT 3, LDT 5 (50 nM) e tansulosina (5 nM). Imagens representativas. Grupo controle: tratado somente com o veículo de diluição das substâncias utilizadas neste ensaio (PBS). Barras correspondem a 20  $\mu\text{m}$ . ..... 92

**Figura 42.** Inibição do crescimento de células oriundas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) por inibidores das vias de sinalização intracelulares envolvidas na transativação de EGFR. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina (FE) 3  $\mu\text{M}$  e avaliado pelo ensaio de MTT (A) e exclusão do Azul de Trypan (B). Foram usados: AG1478 5  $\mu\text{M}$ , como antagonista de EGFR; GM6001 10  $\mu\text{M}$  como inibidor de metaloproteinase; PD98059 1  $\mu\text{M}$  como inibidor de MEK; ou CRM197 200 ng/mL como inibidor específico da HB-EGF. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 3-5 experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. \*\*\* P < 0,001 em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett ). ..... 94

**Figura 43.** LDT3 e o LDT5 inibem a ativação de ERK-1/2 induzida por fenilefrina. Células HPB foram estimuladas com fenilefrina (100  $\mu\text{M}$ , 15 min) na ausência ou presença de LDT3 e LDT5 (1  $\mu\text{M}$ ; pré-incubação de 10 min). Painel superior: Os lisados celulares foram analisados por imunoblotting para p-ERK-1/2 e ERK-1/2 total (experimento típico). Painel inferior: Dados da

análise densitométrica. Os dados (expressos como média  $\pm$  SEM) foram normalizados em relação ao basal considerado 100% (n=3-4)..... 95

**Figura 44.** Representação da estrutura secundária de GPCRs. A ponte dissulfeto (amarelo) que liga TM3 e ECL2 é conservado em 91,8 % dos GPCRs, mas ausente em 7,6 % de membros da família rodopsina. Abreviaturas: TM – segmento transmembranar. Os números indicam o número de resíduos em cada região (média  $\pm$  DP) Modificado de KARNIK e cols., 2003..... 100

## TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de $K_i$ ou $K_B$ para os AR- $\alpha_{1A/D}$ e receptores 5-HT $_{1A}$ . (Nascimento, 2011; PCT/BR2013/00003) .....	26
<b>Tabela 2.</b> Valores de $K_i$ para os AR- $\alpha_{1B}$ e receptores 5-HT $_{2A}$ . (Nascimento, 2011, PCT/BR2013/00003) .....	26
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros fisiológicos avaliados in vivo .....	53
<b>Tabela 4.</b> Propriedades físico-químicas dos derivados <i>N</i> -fenilpiperazínicos .....	65
<b>Tabela 5:</b> Combinação das propriedades físico-químicas e farmacológicas (EL) dos derivados <i>N</i> -fenilpiperazínicos .....	66
<b>Tabela 6.</b> Afinidade dos LDTs por adrenoceptores $\alpha_{1A}$ nativos de próstata de rato .....	68
<b>Tabela 7.</b> Afinidade dos LDTs por receptores não-alvo: AR- $\alpha_{2A}$ , receptores muscarínicos e receptores dopaminérgicos D $_2$ -“like” .....	70
<b>Tabela 8.</b> Razão dos valores de $K_i$ para a determinação da atividade intrínseca dos LDTs nos receptores 5-HT $_{1A}$ .....	73
<b>Tabela 9.</b> Potência dos LDTs por receptores humanos transfectados em células Rat-1, obtidos em ensaios de mobilização de cálcio intracelular .....	77
<b>Tabela 10.</b> Efeito dos LDT3 e LDT5 sobre a temperatura corporal de camundongos .....	79
<b>Tabela 11.</b> Resumo dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores não-alvos .....	101
<b>Tabela 12.</b> Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os AR- $\alpha_2$ .....	102
<b>Tabela 13.</b> Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores muscarínicos .....	102
<b>Tabela 14.</b> Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores dopaminérgicos D $_2$ -“like” .....	103

**Tabela 15.** Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os AR-  
 $\alpha_1$  humanos ..... 105

**Tabela 16.** Os efeitos adversos que poderiam estar associados a um bloqueio  
central dos diferentes receptores acoplados à proteína G ..... 106

# SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
ABREVIATURAS .....	x
FIGURAS .....	xiv
TABELAS .....	xxii
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
I. A. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS .....	2
A.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E SELETIVIDADE .....	2
I. B. FISIOPATOLOGIA DA HPB .....	3
B. 1. PRÓSTATA.....	3
B. 2. CARACTERIZAÇÃO DA HPB.....	7
B. 3. HPB: TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E EVENTOS ADVERSOS ...	9
B.4. RECEPTORES ENVOLVIDOS NA LUTS/HPB .....	15
B.4.1. RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR).....	15
a. FAMÍLIA RODOPSINA DE GPCR .....	16
a.1. ADRENOCEPTORES $\alpha_1$ (AR- $\alpha_1$ ) .....	16
a.2. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT <sub>1A</sub> .....	20
I. C. PROPOSIÇÃO DE NOVA ABORDAGEM FARMACOLÓGICA PARA O TRATAMENTO DA HPB .....	21
C.1. ESTRUTURA PRIVILEGIADA.....	22
C.2. NOVOS DERIVADOS <i>N</i> -FENILPIPERAZÍNICOS.....	23
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>III. MATERIAL &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
III. A. NOVOS DERIVADOS <i>N</i> -FENILPIPERAZÍNICOS .....	30
A. 1. OBTENÇÃO.....	30
A. 2. AVALIAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DOS LDTs .....	30
A. 2.a. “REGRA DOS CINCO” DE LIPINSKI (RO5).....	30
A. 2.b. EFICIÊNCIA DO LIGANTE .....	31
III. B. OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS .....	31
III. C. SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	32
1. ENSAIO FUNCIONAL .....	32
2. ENSAIO DE <i>BINDING</i> COMPETITIVO .....	32

2.A. PREPARAÇÃO DE PROTEÍNA .....	32
2.B. MEIOS DE INCUBAÇÃO PARA EXPERIMENTOS DE BINDING .....	33
2.C. SOLUÇÃO DE LAVAGEM .....	34
2.D. LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO .....	34
3. TAMPÃO PARA ENSAIO DE MEDIDA DE CÁLCIO INTRACELULAR .....	35
4. F. TAMPÃO RIPA .....	35
III.D. RADIOLIGANTES E FÁRMACOS UTILIZADOS .....	35
III.E. ENSAIOS FUNCIONAIS .....	36
E.1. CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA – TIRAS DE PRÓSTATA .....	36
III.F. ENSAIOS DE LIGAÇÃO ( <i>BINDING</i> ) .....	38
1. ADRENOCEPTORES $\alpha_2$ .....	41
1.A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR .....	41
1.B. BINDING DA [ $^3\text{H}$ ]- RX821002 AOS AR- $\alpha_{2A}$ .....	43
2. RECEPTORES MUSCARÍNICOS .....	44
2.A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR .....	44
2.B. BINDING DA [ $^3\text{H}$ ]-QNB AOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS .....	44
3. RECEPTORES D <sub>2</sub> -“ <i>LIKE</i> ” .....	45
3.A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR .....	45
3.B. BINDING DA [ $^3\text{H}$ ]- YM-09151 AOS RECEPTORES D <sub>2</sub> -“ <i>LIKE</i> ” .....	46
4. RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INTRÍNSECA .....	47
4.A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR .....	47
4.B. BINDING DA [ $^3\text{H}$ ]- <i>p</i> -MPPF AOS RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> .....	49
4.C. BINDING DA [ $^3\text{H}$ ]-8-OH-DPAT AOS RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> .....	49
5. DOSAGEM DE PROTEÍNA .....	50
III.G. MEDIDAS DE MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ) .....	50
III.H. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	51
1. EFEITOS DOS LDTs SOBRE COMPORTAMENTO E TEMPERATURA CORPORAL ...	51
2. PRESSÃO INTRA-URETRAL (PIU) .....	53
3. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) .....	56
III.I. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS) ...	57
1. CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS .....	57
2. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i> .....	58
1. MTT (BROMETO DE 3-(4,5-DIMETILIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO) .....	59
2. VIABILIDADE CELULAR – EXCLUSÃO COM AZUL DE TRY PAN .....	60

3. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA.....	61
III. J. ENSAIOS DE WESTERN BLOT .....	62
1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS LDTs SOBRE A VIA DAS MAP-KINASES..	62
III.L. ANÁLISE DOS DADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	63
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
IV. A. AVALIAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DOS LDTs.....	65
IV. A. 1. “REGRA DOS CINCO” DE LIPINSKI (RO5).....	65
IV. A. 2. EFICIÊNCIA DO LIGANTE (EL) .....	65
IV. B. ENSAIOS FUNCIONAIS - CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA – TIRAS DE PRÓSTATA ...	66
IV. C. ENSAIOS DE LIGAÇÃO ( <i>BINDING</i> ) .....	68
1. RECEPTORES NÃO –ALVO (“OFF-TARGET”) .....	68
2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INTRÍNSECA - RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> ..	70
IV. D. MEDIDAS DE MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ) .....	73
IV.E. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	78
1. EFEITOS DOS LDTs SOBRE COMPORTAMENTO E TEMPERATURA CORPORAL.	78
2. PRESSÃO INTRA-URETRAL (PIU).....	80
3. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) .....	82
IV.F. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS) .	84
IV.G. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CÉLULAR E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA.....	91
IV.H. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS) – TRANSATIVAÇÃO DE EGFR POR AR- $\alpha_{1D}$ .....	93
IV. I. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS LDTs SOBRE A VIA DAS MAP-KINASES. ....	95
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>96</b>
POTENCIAL TEÓRICO .....	97
SELETIVIDADE.....	97
ATIVIDADE <i>IN VIVO</i> .....	105
ATIVIDADE INTRÍNSECA – RECEPTORES 5-HT <sub>1A</sub> .....	107
AÇÃO ANTI-PROLIFERATIVA .....	108
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	110
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>112</b>

<b>VII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>
-------------------------------	------------

**ANEXOS**

*Introdução*

---

## I. A. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Diversas estratégias para o desenho molecular de fármacos estão disponíveis. A abordagem fisiológica, corresponde a uma dessas estratégias, a qual depende da eleição do alvo-terapêutico, o que por sua vez depende do conhecimento do processo fisiopatológico envolvido (KUBINYI, 1995, LINDSAY, 2003).

Durante muitos anos a principal estratégia no desenvolvimento de fármacos foi a busca por moléculas com alvos únicos e altamente seletivas (“*magic bullet*”), como idealizado inicialmente por Paul Ehrlich (revisado em ROTH e cols., 2004). Mais recentemente a proposta de que fármacos multi-alvos (do inglês “*multi-target drugs*”) seriam mais interessantes do que fármacos altamente seletivos vem ganhando espaço (CSERMELY e cols., 2005; LU e cols., 2012). Doenças de maior complexidade podem envolver a alteração de várias vias de sinalização celular e, portanto, fármacos que sejam direcionados para atuar em diferentes receptores podem ser terapêuticamente úteis (HUBER e cols., 2008).

Um exemplo de uma condição clínica que envolve diversas vias de sinalização celular é a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (ROEHRBORN, 2008). E nesses casos a polifarmacologia, ou seja, fármacos capazes de atuar através de múltiplos-alvos modulando diferentes vias de sinalização, parece ser mais apropriada (PETERS, 2013).

### A.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E SELETIVIDADE

No contexto de desenvolvimento racional de novos fármacos, no qual se objetiva aumentar a probabilidade de obtenção de novos candidatos a protótipos de fármacos, a busca é por candidatos que não somente apresentem os requisitos farmacofóricos apropriados, mas também propriedades de solubilidade adequadas (DUARTE e cols., 2007). Na literatura são descritas algumas estratégias com este objetivo como, por exemplo, o trabalho de LIPINSKI e colaboradores (2001), que descreveu a “Regra dos 5”, ou o trabalho de HOPKINS e colaboradores (2014), que descrevem a “Eficiência do Ligante” (EL).

A seletividade também é uma propriedade muito levada em conta no desenvolvimento de fármacos. Ela corresponde à capacidade que um fármaco tem em reconhecer e se ligar, com maior afinidade, a alvos moleculares desejáveis para a abordagem farmacológica, em detrimento à ligação a outros alvos. Evitando assim eventos adversos decorrente de afinidades por outros receptores ou, até mesmo ações em sistemas que não são os desejáveis para a aplicação desse novo composto ao tratamento farmacológico de uma determinada doença ou condição clínica.

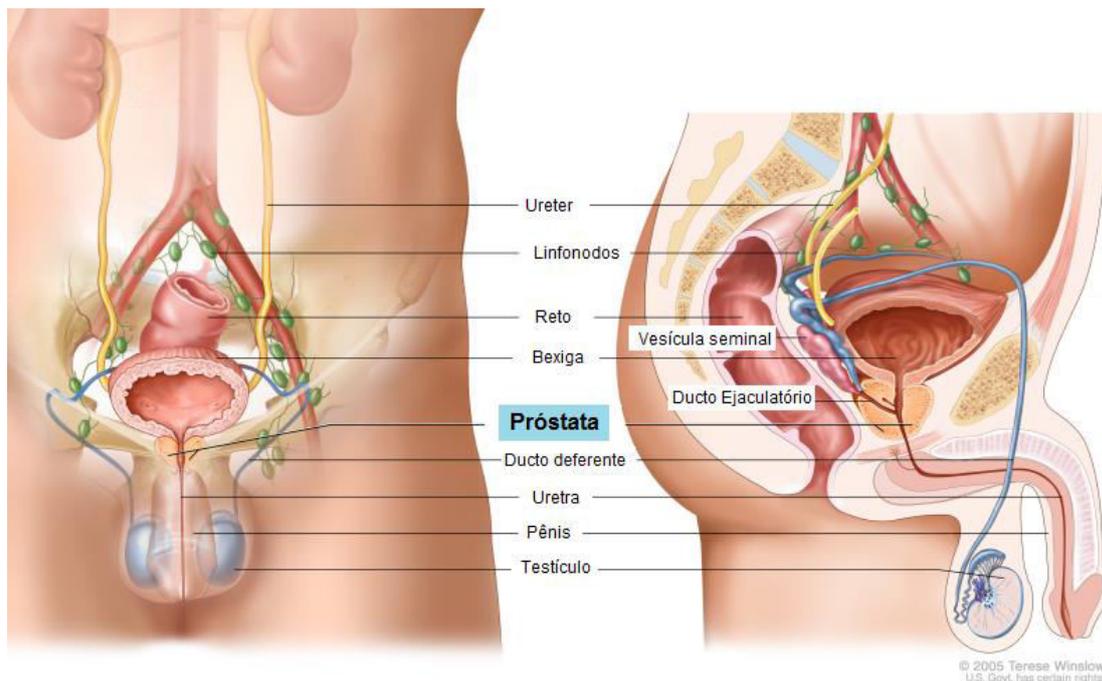
## **I. B. FISIOPATOLOGIA DA HPB**

A HPB é uma alteração histológica benigna da glândula prostática. Sua prevalência está relacionada com o envelhecimento, onde o auge de sua ocorrência se dá por volta de 80-90 anos de vida dos homens (RICKE e cols., 2011). Assim, sua prevalência salta de aproximadamente 50% dos homens em torno de 50 anos de idade, atingindo 80% da população masculina aos 80 anos (ROEHRBORN e cols, 2002; BURNETT & WEIN, 2006).

### **B.1. PRÓSTATA**

A próstata é uma glândula exócrina que faz parte do sistema genital masculino. É um órgão que está presente somente em mamíferos e difere anatômica, química e fisiologicamente, entre as diferentes espécies. A principal diferença é a presença da cápsula prostática que envolve e preserva a integridade tecidual da próstata humana (MARKER e cols., 2003; GANDELLINI e cols., 2012) que não é encontrada em roedores, por exemplo. Além disso, a arquitetura dos ossos do assoalho pélvico difere entre quadrúpedes e bípedes e acarretam em diferenças estruturais (PRADIDARCHEEP e cols., 2011)

Situada imediatamente inferior à bexiga, a próstata envolve a porção proximal da uretra (Fig. 1). Em adultos, a próstata é uma estrutura densa que repousa sobre a parte anterior da pelve (MYERS e cols., 2010).



*Figura 1: Ilustração da anatomia do sistema reprodutor e urinário masculino mostrando, em destaque, a próstata entre outros órgãos.*  
Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0025017/?figure=1>  
Acessado em 25.08.2015

A função da próstata humana é produzir e armazenar um fluido incolor e ligeiramente alcalino (pH 7,29) que corresponde a 10-30% do volume do fluido seminal. Desta forma, o líquido prostático juntamente com o fluido produzido pelas vesículas seminais e os espermatozóides constitui o sêmen. Em outras palavras, a próstata é responsável pela produção, armazenamento e secreção da porção líquida do sêmen na ejaculação (BURDEN e cols., 2006, MYERS e cols. 2010). A próstata também desempenha importante função no mecanismo de continência urinária masculina, uma vez que sua localização, circundando o colo vesical e a uretra proximal, permite o desenvolvimento de tal papel (ZAICHICK, 2014).

No adulto, a próstata é dividida de acordo com sua origem embriológicas, características histológicas, divisões anatômicas, funções e susceptibilidade a doenças, em quatro zonas anatomicas (MCNEAL 1968; MYERS e cols., 2010; WADHERA, 2013) (Fig. 2):

- A zona periférica - ocupa a parte posterior da próstata e compreende 70-75% da glândula;
- A zona central – localizada na parte superior, situa-se em torno dos ductos ejaculatórios e compreende 20-25% da glândula;
- A zona de transição - envolve a uretra compreendendo a 5-10% da glândula;
- Estroma fibromuscular – ocupa a superfície anterior, sendo composto de músculo liso e do tecido fibroso.

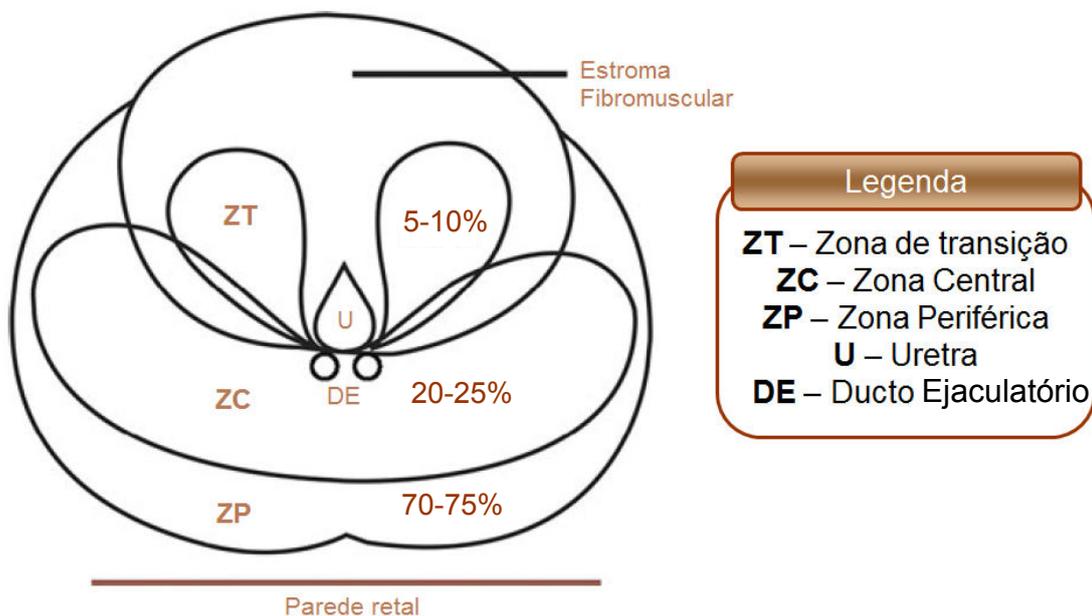
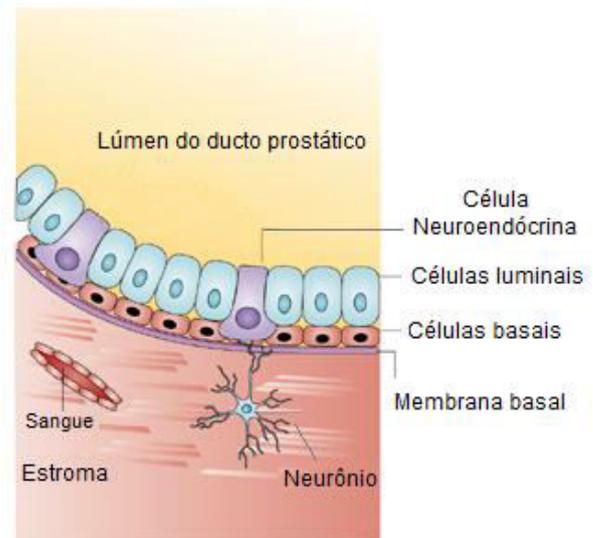


Figura 2. Diagrama esquemático das zonas prostáticas humanas. Corte transversal.  
Modificado de: Adaptado a partir MYERS e cols., 2010

A próstata é composta por células glandulares, cuja secreção é drenada pelos ductos prostáticos ramificados que se abrem na superfície posterior do interior da uretra proximal. Os ductos estão imersos em um estroma composto em sua maior parte por musculatura lisa, apresentando também outros tipos celulares, tais como: fibroblastos, miofibroblastos e células neuronais, linfáticas e vasculares. Tais ductos são constituídos por epitélio estratificado, o qual é

caracterizado por três tipos celulares (BOK & SMALL, 2002, SIGNORETTI & LODA, 2006, NELSON e cols., 2007, GANDELLINI e cols., 2012) (Fig. 3):

- células colunares altas (células luminais) – revestem o lúmen glandular, e correspondem às células secretórias propriamente ditas;
- células cuboides (células basais) – que formam uma camada basal subjacente à membrana basal
- células neuroendócrinas (NE) – que se localizam entre as células secretórias e estão presentes em menor proporção. São enriquecidas em grânulos contendo a amina biogênica serotonina (5-HT) e alguns peptídeos.



*Figura 3: Ilustração do epitélio prostático, mostrando as diferentes células que o compõem. Modificado de BOK & SMALL, 2002.*

O desenvolvimento normal da próstata se dá pela secreção de testosterona pelos testículos a partir da fase fetal. Desde o nascimento até puberdade, a próstata pesa aproximadamente 1-2 g, mas aumenta até cerca de 20 g durante a puberdade, podendo ter seu tamanho comparado ao de uma castanha na fase adulta (HADDAD e cols., 2001).

A próstata cresce ao longo do envelhecimento, mas este aumento difere entre as diferentes zonas: a zona central pode ter seu tamanho triplicado (WELL e cols., 2007), enquanto que a zona periférica permanece com tamanho semelhante durante toda a vida (MCNEAL, 1968).

A zona de transição apresenta fibras musculares lisas entrelaçadas, além de um estroma mais denso. Seu remodelamento ao longo do envelhecimento envolve a formação de nódulos contendo elementos

principalmente estromais (ALONSO-MAGDALENA e cols., 2009; LEE e cols., 2011). Devido à sua localização anatômica, o crescimento desta região está intimamente relacionado com a HPB acarretando nos sintomas obstrutivos e dinâmicos desta condição (TANNENBAUM e cols., 1983; revisto em HIEBLE & RUFFOLO, 1996, SAMPSON e cols., 2007). A razão estroma:epitélio é diferenciada no desenvolvimento da hiperplasia ou em casos em que há o crescimento natural da próstata, com ausência de hiperplasia. Ou seja, em casos de HPB sintomática, esta razão é de cerca de 5:1 enquanto que na ausência da hiperplasia é 2:1 (MCNEAL e cols., 1990 KYPRIANOU e cols., 2003).

## **B.2. CARACTERIZAÇÃO DA HPB**

A HPB corresponde a uma condição clínica progressiva e relacionada ao envelhecimento, que apresenta um impacto considerável na qualidade de vida de uma grande parcela da população masculina (NICKEL, 2003). Ela resulta de um desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose (ROEHRBORN, 2008; SCIARRA e cols., 2008). Histologicamente, a HBP é caracterizada por uma hiperplasia tanto glandular (epitelial) quanto estromal (fibromuscular), sendo este último o fator dominante na patogênese da HPB (MALLOY e cols., 1998; SHAPIRO e cols., 1992). A proliferação de células estromais da próstata periuretral e a contração da musculatura lisa prostática contribuem para os sintomas do trato urinário inferior (do inglês *Lower Urinary Tract Symptoms* (LUTS)) sugestivos de HBP (LUTS / HBP) (ROEHRBORN, 2008).

A fisiologia da LUTS/HPB apresenta dois componentes principais: um componente estático relacionado com o aumento da massa celular prostática; e um componente dinâmico relacionado às variações no tônus simpático do músculo liso prostático mediado por adrenoceptores  $\alpha_1$  (CAINE e cols., 1975, MALLOY e cols., 1998, MICHELOTTI e cols., 2000) (Fig. 4). Os sintomas obstrutivos são caracterizados por jato fraco e intermitente com volume residual de urina na bexiga, enquanto que o sintomas irritativos, correspondem a noctúria, urgência e aumento da frequência urinária. Há ainda um possível

componente vesical na HPB decorrente inicialmente da hiperatividade do músculo detrusor em resposta à obstrução da uretra, com falência da musculatura a longo prazo (MCNEAL, 1990, ROEHRBORN, 2011, NICHOLSON & RICKE, 2011, OSMAN e cols., 2014).

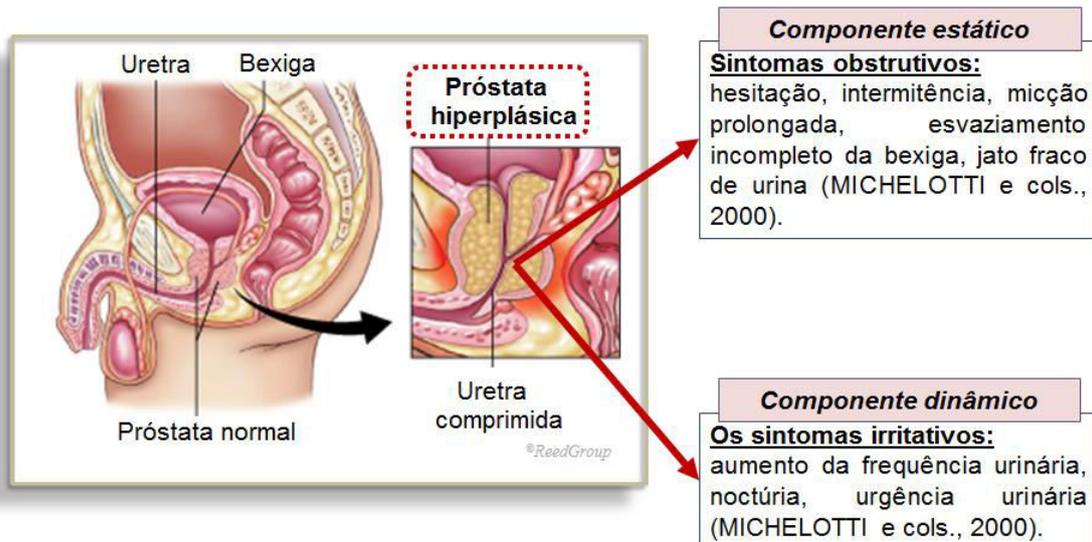


Figura 4. Ilustração da próstata normal e hiperplásica (Modificada de ©ReedGroup - <http://www.mdguidelines.com/prostatic-hyperplasia>)

A HPB é uma condição clínica multifatorial e sua etiologia ainda não completamente elucidada. Sua ocorrência é dependente parcialmente de andrógenos circulantes, como a testosterona e principalmente de seu metabólito ativo a di-hidrotestosterona (DHT), os quais são importantes no desenvolvimento e crescimento normal da próstata (CARSON & RITTMASER, 2003). A DHT promove a proliferação do epitélio glandular e de miofibroblastos da zona de transição, além da inibição de apoptose (CARSON & RITTMASER, 2003; PRIEST e cols., 2012). Contudo, os níveis de DHT não são diretamente relacionados ao crescimento prostático, sugerindo que além da ação androgênica, outros fatores poderiam estar envolvidos na etiologia da HPB (LEPOR e cols., 2004). Outros estudos mostram que esse aumento prostático pode estar relacionado a fatores de crescimento, síndrome metabólica, estresse oxidativo, poluentes ambientais, inflamação, hereditariedade e a interação entre o epitélio e estroma prostático (BOSTANCI

e cols., 2013, BARCLAY e cols., 2005, HARMAN e cols., 2001, NICKEL e cols., 1999, PRAJAPATI e cols., 2013).

Alguns estudos recentes também sugerem a participação de adrenoceptores (AR) AR- $\alpha$ 1, mais especificamente o subtipo  $\alpha_{1D}$ , e receptores serotoninérgicos, subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, no processo de proliferação celular (KOJIMA e cols., 2009, ABDUL e cols., 1994, DIZEYI e cols., 2004, SIDDIQUI e cols., 2006). Como veremos mais detalhadamente a seguir.

Embora não seja alvo desse estudo cabe ressaltar que outros trabalhos tratam do envolvimento de outras vias de sinalização que possam ser moduladas para o alívio dos sintomas obstrutivos da HPB. Por exemplo, como revisto em ÜCKERT & OELKE (2011), estudos clínicos apontam que o uso de inibidores de fosfodiesterase (PDE), tais como sildenafil e tadalafil, oferecem grandes oportunidades no tratamento da disfunção do trato urinário inferior. Tais inibidores contêm a degradação do segundo mensageiro GMP cíclico, um importante mediador endógeno envolvido na contração de musculatura lisa (RYBULKIN e cols., 2003)

### **B.3. HPB: TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E EVENTOS ADVERSOS**

Clinicamente a determinação de início e tipo de terapia se baseia num índice internacional de sintomas prostáticos (IPSS) do inglês “*International Prostatic Symptoms Score*”. O IPSS é um questionário composto de perguntas que avaliam a frequência de sete sintomas associados ao crescimento prostático (Fig. 5). As respostas recebem uma pontuação que varia de 0 a 5 de acordo com a frequência dos sintomas. A oitava pergunta, em separado, avalia a qualidade de vida do homem em relação ao seu ato de urinar. Quanto maior o resultado desta pergunta, pior é a sua qualidade de vida. A soma destas pontuações fornece o escore de sintomas, que pode variar de 0 a 35.

Os sintomas são considerados como:

- Leves - para valores entre 0 e 7;
- Moderados – para valores entre 8 e 10;
- Graves – para valores entre 20 e 35.

É importante considerar que a aplicação de escores de sintomas não substitui a abordagem pessoal do médico com o seu paciente na quantificação dos sintomas e avaliação do impacto sobre a qualidade de vida do mesmo (Guideline da Associação Americana de Urologia, AUA do inglês “*American Urological Association*”, 2003).

No último mês	Nenhuma	Menos de 1 a cada 5 vezes	Menos da metade das vezes	Metade das vezes	Mais que a metade das vezes	Quase sempre	Seu escore
<b>1. Esvaziamento incompleto</b> Teve a sensação de esvaziamento incompleto da bexiga	0	1	2	3	4	5	
<b>2. Frequência</b> Urinou novamente num intervalo inferior a 2 horas	0	1	2	3	4	5	
<b>3. Intermitência</b> Teve o fluxo de urina interrompido	0	1	2	3	4	5	
<b>4. Urgência</b> Dificuldade em conter a urina	0	1	2	3	4	5	
<b>5. Fluxo urinário</b> Jato fraco	0	1	2	3	4	5	
<b>6. Disúria</b> Força ao urinar	0	1	2	3	4	5	
	Nenhuma	1 vez	2 vezes	3 vezes	4 vezes	5 vezes	
<b>7. Noctúria</b> Despertar durante à noite para urinar	0	1	2	3	4	5	
						Total: Pouco insatisfeito	
<b>Qualidade de vida</b> Se você tivesse que passar o resto da sua vida com esta condição urinária que tem hoje, como se sentiria?	Muito satisfeito	Satisfeito	Parcialmente satisfeito	Indiferente		Insatisfeito	Infeliz
	0	1	2	3	4	5	6

Figura 5. Questionário que avalia sintomas associados à HPB. IPSS (do inglês, “*International Prostatic Symptoms Score*”) Adaptado a partir <http://www.urospec.com/uro/Forms/ipss.pdf> Acessado em 25.08.2015

A ausência ou ineficiência de uma abordagem farmacológica pode resultar em complicações (ou eventos adversos da HPB) tais como: retenção urinária aguda, incontinência urinária, insuficiência renal, infecção recorrente do trato urinário e prostatite, lesão vesical funcional e anatômica, presença de cálculos na bexiga (SPEAKMAN & CHENG, 2014). Assim, o tratamento farmacológico visa melhora dos sintomas (LUTS/BPH) e redução das complicações da HPB.

A HPB constitui um problema de saúde pública. GROVES e colaboradores (2013) avaliaram retrospectivamente as causas de internação de 3,7 milhões de homens com mais de 50 anos em hospitais do estado da Califórnia (EUA) entre 2007 e 2010. Os resultados revelaram que o número de internações em decorrência de retenção urinária aguda secundária à HPB aumentou em 25% no período estudado. Em outro estudo avaliando dados do sistema nacional de saúde dos EUA relativos ao período de 1998 a 2008, STROUP e colaboradores (2011) detectaram um aumento de 400% no número de internações por falência renal decorrente de HPB. Naturalmente todas estas ocorrências acarretam um custo associado ao sistema de saúde, além da redução da capacidade produtiva econômica por parte dos pacientes.

A utilização de um tratamento farmacológico para a HPB deve proporcionar ao paciente alívio do LUTS/BPH com o menor número ou intensidade de efeitos adversos possíveis (O'SULLIVAN e cols., 2004). E o critério para a escolha de melhor terapia farmacológica é baseada no IPSS, no antígeno prostático específico (PSA, do inglês "*Prostate Specific Antigen*") e tamanho da próstata (MARBERGER e cols., 2012) (Fig. 6). Atualmente, são duas as principais opções de tratamento farmacológico da HPB: uso de antagonistas de AR- $\alpha_1$  e de inibidores da 5 $\alpha$ -redutase (enzima que promove a conversão da testosterona em DHT) (Fig. 6).

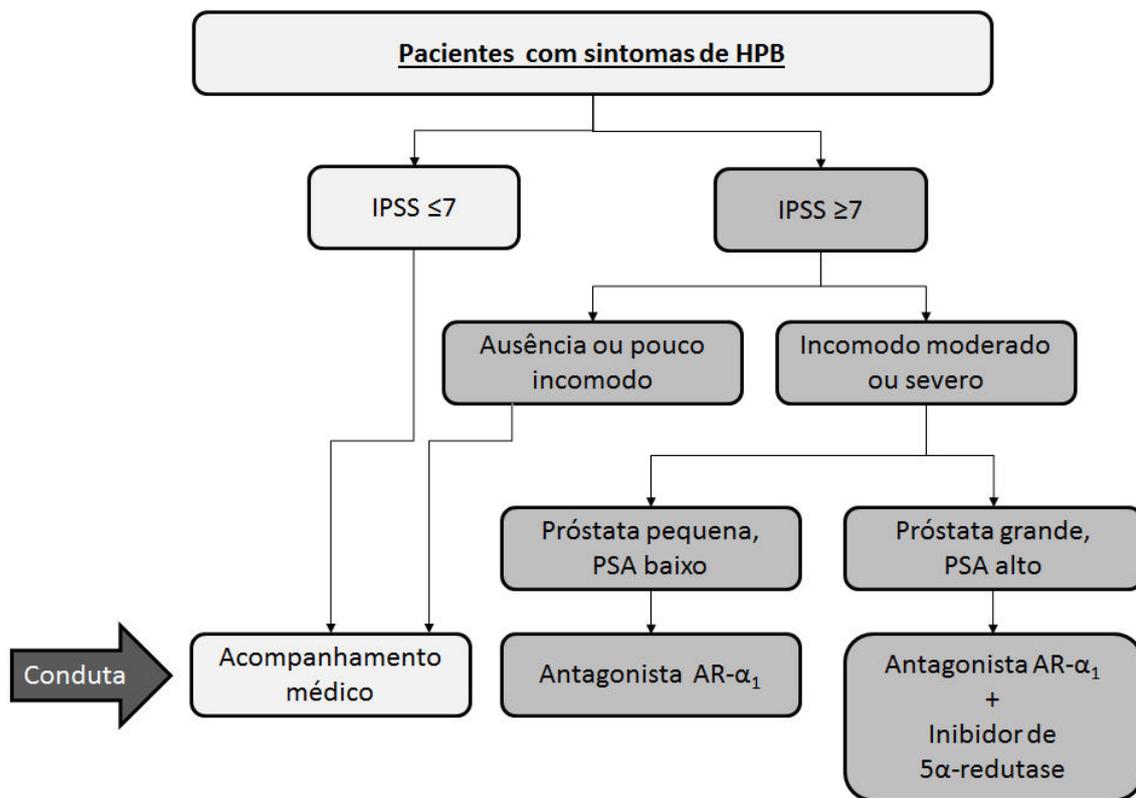


Figura 6. Organograma para a decisão da conduta a ser tomada para o tratamento da HPB. IPSS (do inglês, “International Prostatic Symptoms Score”) resultado de questionário que avalia sintomas associados à HPB. PSA: Antígeno Prostático específico (do inglês “Prostate Specific Antigen”) Adaptado a partir MARBERGER e cols., 2012.

O tratamento com antagonistas dos AR- $\alpha_1$  promove o alívio do LUTS/HPB através do relaxamento da musculatura lisa prostática, além de relaxar o colo da bexiga e da uretra, resultando no aumento do fluxo urinário e esvaziamento da bexiga, conforme será discutido detalhadamente a seguir. Desta forma, os antagonistas de AR- $\alpha_1$  vão atuar aliviando somente o componente dinâmico da HPB não tendo qualquer efeito sobre a progressão dessa condição clínica.

Atualmente, são aprovados, pela agência reguladora de medicamentos norte americana (FDA - “Food and Drug Administration”), cinco antagonistas dos AR- $\alpha_1$ : terazosina, doxazosina, tansulosina, alfuzosina e silodosina. Estudos mostram que todos os eles são igualmente eficazes na redução de LUTS/HPB, porém, antagonistas seletivos AR- $\alpha_{1A}$  ou uroseletivos apresentam

melhor tolerabilidade pelos pacientes, sendo considerados de primeira escolha para o tratamento da HPB moderada a severa (NICKEL, 2006, ITO e cols., 2006, HIEBLE, 2011, HENNENBERG e cols., 2014).

Os sintomas decorrentes do componente estático da HPB estão relacionados com aumento do volume prostático propriamente dito e formação de nódulos fibrosos, que em virtude da cápsula prostática, comprimem fisicamente a uretra, obstruindo a saída da urina da bexiga. Tal aumento é, em parte, devido à DHT, como discutido anteriormente (KENNY, 1996; TIWARI e cols., 2005, CARSON & RITTMASER, 2003; PRIEST e cols., 2012). Desta forma, o uso de inibidores da enzima 5 $\alpha$ -redutase, enzima que promove a conversão da testosterona em DHT, como por exemplo finasterida e dutasterida, tem a finalidade de conter tal crescimento prostático. Esses inibidores promovem, a longo prazo, a atrofia da próstata uma vez que apresentam efeito apoptótico sobre o epitélio dependente de andrógeno (CARSON & RITTMASER, 2003, UNTERGASSER e cols., 2005). Contudo, os inibidores da 5 $\alpha$ -redutase não atuam no componente dinâmico da HPB e não promovem o alívio imediato dos sintomas obstrutivos.

No estudo “THE VETERANS AFFAIRS COOPERATIVE STUDIES BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA STUDY GROUP” que comparou por 1 ano a eficácia da terazosina e finasterida sobre o fluxo urinário e IPSS, o antagonista AR- $\alpha_1$  foi superior à finasterida (LEPOR e cols. 1996). Contudo, no estudo Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Research Group, comparando a eficácia do antagonista AR- $\alpha_1$  doxazosina, finasterida ou doxazosina associada ao inibidor da 5- $\alpha$  redutase finasterida por 4,5 anos e envolvendo 3047 pacientes, foi observado que inicialmente os tratamentos com doxazosina como monoterapia ou associada eram equivalentes quanto a melhora do LUTS/HPB. Contudo, após o segundo ano, a terapia combinada se mostrou mais eficaz que a monoterapia com doxazosina na redução do evento adverso de retenção urinária aguda (MCCONNELL e cols., 2003). No grupo de pacientes tratados com finasterida ocorreram 4 casos de câncer de mama, mas a possível relação entre este evento e o tratamento, além de outras complicações, tem sido alvo de discussão na literatura e ainda não se chegou a um consenso (SCHAUER & MADERSBACHER, 2015). Contudo, o uso

prolongado de inibidores da 5- $\alpha$  redutase está associado efeitos adversos de ordem sexual, tais como a redução da libido e disfunção erétil (MCCONNELL e cols., 2003, KIRBY e cols., 2003, LEPOR e cols., 1996), o que causa um grande impacto na qualidade de vida do paciente em idade sexual ativa.

A associação de inibidores da 5- $\alpha$ -redutase e antagonista AR- $\alpha_1$ , recomendada em casos de IPSS maior que 7, níveis elevados de PSA (acima de 2,5 ng/ml) e tamanho da próstata (valores considerados normais entre 20-30 g) (MARBERGER e cols., 2012), é amplamente discutido na literatura em comparação à monoterapia com antagonistas AR- $\alpha_1$  (LEPOR e cols., 1996, MCCONNELL e cols., 2003, KIRBY e cols., 2003), todavia ainda não se chegou a um consenso.

Desta forma, ainda que antagonistas de AR- $\alpha_1$  apresentem a hipotensão postural como um dos efeitos adversos, principalmente em pacientes idosos, o padrão ouro no tratamento da HPB é o uso de antagonistas de AR- $\alpha_1$  de acordo com as Associações Americana e Européia de Urologia (MC VARY e cols., 2011, OELKE e cols., 2013). Dentre os fatores que contribuem para a hipotensão postural, um dos mecanismos é o bloqueio de AR- $\alpha_{1B}$  em vasos de resistência, os quais tem sua expressão aumentada em idosos (RUDNER e cols., 1999, LEPOR, 2007).

A tansulosina, fármaco em uso clínico no Brasil, apresenta alta afinidade pelos AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$ , e, assim, menor incidência de hipotensão como efeito adverso. De acordo com diferentes modelos experimentais utilizando receptores clonados ou nativos, a diferença de afinidade ( $K_d$  ou  $K_B$ ) entre os AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1B}$  varia de 2 a 14 vezes (PULITO e cols., 2000; MICHEL e GOEPEL, 1998; RICHARDSON e cols., 1997). Entretanto, de acordo com ensaios de dissociação, o tempo de meia vida de dissociação da tansulosina dos AR- $\alpha_{1A}$  parece ser maior em relação aos demais adrenoceptores (SATO e cols., 2012).

## B.4. RECEPTORES ENVOLVIDOS NA LUTS/HPB

### B.4.1. RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR)

Receptores de aminas biogênicas, por exemplo vários subtipos de adrenocetores (AR), receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos e mucarínicos, correspondem a proteínas de membrana acoplados à proteína G heterotrimérica e por isto são também denominados “receptores acoplados à proteína G” (GPCR).

Os GPCR apresentam sete domínios transmembranares (TM) e são ativados por ligantes procedentes do meio extracelular, desencadeando cascatas de sinalização intracelular (BOCKAERT, 1999). Esta família de GPCR possui mais de 800 receptores e constitui o mais diversificado grupo de proteínas codificado pelo genoma humano (GUDERMANN e cols., 1997, LANDER e cols, 2001, VENTER e cols, 2001, MARINISSEN & GUTKIND, 2001, GEORGE e cols., 2002, FREDRIKSSON e cols., 2003, BJARNADÓTTIR e cols., 2006). A ligação de um ligante extracelular promove uma mudança conformacional do receptor que é refletida na exposição de um domínio de sinalização na porção C-terminal intracelular e interação com uma proteína G heterotrimérica (OLDHAM & HAMM, 2008).

Segundo a *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* ((IUPHAR) - Receptor Database; [www.iuphar.org](http://www.iuphar.org)), os GPCR são classificados pela classificação “GRAFS”, estabelecida em 2005 (SCHIÖTH & FREDRIKSSON, 2005) que divide os GPCR de vertebrados em cinco classes:

- G** - Família glutamato;
- R** - Família rodopsina;
- A** - Família de receptores de adesão;
- F** - Família Frizzled;
- S** - Família da Secretina

### a. FAMÍLIA RODOPSINA DE GPCR

Os receptores de aminas biogênicas fazem parte da família *R* do sistema GRAFS. De acordo com OVERINGTON e colaboradores (2006), os fármacos que possuem como alvo farmacológico esta família de GPCR correspondem a aproximadamente 1/4 do mercado farmacêutico mundial. Isso se justifica devido ao principal papel desses receptores, que é o de reconhecer uma diversidade de ligantes extracelulares endógenos e exógenos como hormônios, proteínas, lipídeos, neurotransmissores, entre outros (BJARNADÓTTIR e cols., 2006; OLDHAM & HAMM, 2008), o que os envolve em diversos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos.

GPCR's da família *R* apresentam uma grande similaridade na sequência de aminoácidos em regiões específicas destes receptores. E de fato, sabe-se que AR- $\alpha_1$ , receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> e receptores dopaminérgicos, por exemplo, apresentam um alto grau de similaridade estrutural, em especial nas suas regiões hidrofóbicas transmembranares que são responsáveis pelo reconhecimento de ligantes (HIBERT e cols., 1991, TRUMPP-KALLMEYER e cols., 1992, GLENNON e cols., 1993, FIORINO e cols., 2005).

#### a.1. ADRENOCEPTORES $\alpha_1$ (AR- $\alpha_1$ )

Diversos estudos têm caracterizado a presença desses receptores, predominantemente os subtipos  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$ , no trato urinário inferior. Na bexiga humana, o AR- $\alpha_{1A}$ , e predominantemente o AR- $\alpha_{1D}$  estão expressos no músculo detrusor, base da bexiga e no urotélio, e envolvidos na contração da base da bexiga (CHEN e cols., 2005; MICHEL e VRYDAG, 2006; MALLOY e cols., 1998). Em modelo de ratos com obstrução ao esvaziamento da bexiga, foram observados redução da expressão de AR- $\alpha_{1A}$  e aumento em até 40% da expressão de AR- $\alpha_{1D}$  na bexiga (revisado em MICHEL e VRYDAG, 2006). Em pacientes com obstrução ao esvaziamento da bexiga há maior resposta contrátil do músculo detrusor em resposta à fenilefrina (BOUCHELOUCHE e cols., 2005).

Na próstata (e uretra) humana, de acordo com estudos de ligação e estudos funcionais, o subtipo  $\alpha_{1A}$  é o predominantemente expresso no estroma e epitélio prostático, sendo responsável pela contração muscular (PRICE e cols., 1993, FORRAY e cols., 1994, TSENG-CRANK e cols., 1995).

Na HPB AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  têm sua expressão prostática aumentada. De acordo com NASU e colaboradores (1996) há um aumento em cerca de seis vezes no RNA mensageiro (RNAm) total de AR- $\alpha_1$ , sendo que os níveis de RNAm  $\alpha_{1D}$  aumentam em 3 vezes (NASU e cols., 1996). O aumento da expressão de AR- $\alpha_1$  leva a uma super regulação desta via (TESTA e cols., 1993, FORRAY e cols., 1994, NASU e cols., 1996, MARUYAMA e cols., 1998, MICHELOTTI e cols., 2000, MICHEL & VRYDAG, 2006).

A contração da musculatura lisa vascular e não vascular corresponde a função fisiológica clássica mediada por AR- $\alpha_1$ , além do envolvimento na hipertrofia cardíaca, proliferação celular de musculatura lisa vascular, hepatócitos e próstata (ROKOSH e cols., 1996, ZHONG & MINNEMAN, 1999, MICHELOTTI e cols., 2000, PIASCIK & PEREZ, 2001, KOJIMA e cols., 2009).

No trato urinário inferior, os mecanismos celulares via AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  envolvidos nesses processos já foram, em parte, estabelecidos. O mecanismo de contração muscular já é bastante conhecido e descrito na literatura. Em linhas gerais, na presença de um agonista, os AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  são ativados causando a dissociação da proteína Gq, gerando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ . Subsequentemente, a subunidade  $\alpha$ Gq ativa a fosfolipase C $\beta$ 1 (PLC- $\beta$ 1) e a GTPase monomérica RhoA (HENNENBERG & GRATZKE, 2013). A PLC- $\beta$ 1 hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) da membrana formando os segundos mensageiros inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> causa a abertura dos canais de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático aumentando a concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup>. A abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> (do tipo L) dependentes de voltagem mediada por reações de fosforilação, e canais de Ca<sup>2+</sup> operados por ligante, propicia uma corrente massiva de Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular para o meio intracelular. O aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular leva à ativação da calmodulina e da proteína cinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMK II), a qual fosforila um resíduo serina

na cadeia leve da miosina (CLM), favorecendo a interação actina-miosina (WU e cols., 1992, DOCHERTY, 2010), levando à contração muscular.

Além disso, contribuindo com a contração muscular, o DAG estimula as isoformas da proteína cinase C (PKC), de maneira independente ou não de  $Ca^{2+}$ . PKC gera a inibição da fosfatase de CLM através da fosforilação da subunidade regulatória, ocorrendo sensibilização dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$ , o que resulta em uma maior fosforilação da CLM (SOMLYO & SOMLYO, 2003, HENNENBERG e cols, 2013).

A expressão aumentada dos AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  durante a HPB com consequente super regulação de suas vias, pode culminar na ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), também conhecidas como proteínas cinases ativadas por sinais extracelulares (ERK 1/2). Estas proteínas comunicam sinais extracelulares ao núcleo através da ativação de uma série de proteínas cinases que culminam na transcrição de diversos genes envolvidos na hipertrofia e proliferação celular (GARCIA-SAINZ e cols., 1999, GENTILI e cols., 2002, KUBO e cols., 2005, DELLA e cols., 1997).

Enquanto que a via canônica de sinalização mitogênica ativada por GPCR é razoavelmente bem definida (ROZENGURT, 2007), uma via menos elucidada, mas igualmente importante da sinalização de GPCR, é a sua capacidade para modular receptores tirosina cinase, tais como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (DAUB e cols., 1996). A participação do EGFR na sinalização de GPCR é um processo de transativação crítico para a atividade mitogênica em alguns modelos (DAUB e cols., 1996, PRENZEL e cols., 1999) e já foi descrito no trato reprodutor masculino (revisto em AVELLAR e cols., 2009).

Um dos mecanismos moleculares propostos para este processo de transativação envolve a ativação de um conjunto distinto de metaloproteases e a geração de determinados membros da família EGF, que, por sua vez, ativam EGFR de maneira autócrino/parácrina (PRENZEL e cols., 1999; LIEBMANN, 2011) (Fig. 7).

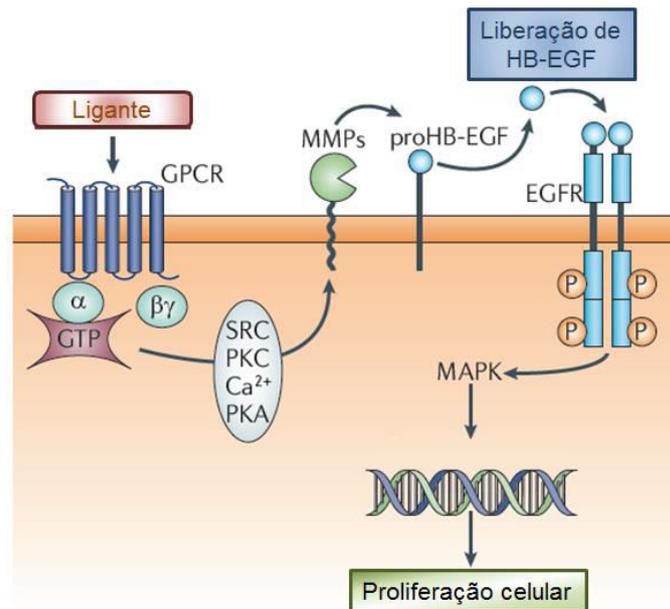


Figura 7. Esquema da transativação de EGFR induzida por GPCR – Modificado de LAPPANO & MAGGIOLINI, 2011. Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) induzem a transativação de receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR). Tal transativação pode envolver vários mediadores, tais como proteínas quinases não-receptoras (SRC), cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ), a proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA). Estes mediadores ativam metaloproteinases de matriz (MMP) que vão clivar pro-HB-EGF, liberando o fator de crescimento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF), que irá ativar os EGFR. Este receptor, por meio da via das MAPK, vai induzir a proliferação celular.

Diversos estudos mostram que a transativação de EGFR está envolvida na sinalização de AR- $\alpha_1$ . Por exemplo, a proliferação de células mediada por AR- $\alpha_1$  e contração vascular é dependente da ativação de cinases mediadas pelo EGFR (OGANESIAN e cols., 2011, ULU e cols., 2010, ZHANG e cols., 2004). A transativação de EGFR por AR- $\alpha_{1B}$  está envolvido no mecanismo de dessensibilização do receptor (CASAS-GONZÁLEZ e cols., 2006). Desta forma a ativação de AR- $\alpha_1$  podem, pelas vias canônica e não-canônica, culminar em eventos proliferativos.

KIM e colaboradores (2009) demonstraram que a fenilefrina, agonista não seletivo AR- $\alpha_1$ , induz alterações celulares compatíveis com HPB. KOJIMA e colaboradores demonstraram no mesmo ano a participação do AR- $\alpha_{1D}$  na regulação da proliferação celular, inclusive em tecido prostático humano e de roedores. A ativação desses receptores induz a proliferação celular estromal, epitelial e de musculatura lisa, e o bloqueio destes receptores previne este

efeito. Há um fármaco em uso clínico no Japão, o Naftopidil, que inibe a proliferação estromal e epitelial da próstata. Este fármaco é um derivado *N*-fenilpiperazínico e antagonista com maior afinidade pelo subtipo AR- $\alpha_{1D}$  (KOJIMA e cols., 2009, MICHEL, 2010, HARA e cols., 2013, HENNENBERG e cols., 2014).

Antagonistas AR- $\alpha_1$ , tais como a tansulosina, são utilizados para o tratamento da HPB, uma vez que levam ao relaxamento da musculatura lisa prostática e aliviam os sintomas obstrutivos da HPB (MCNEAL, 1990, ZAKARIA e cols., 2001, NICKEL, 2006). Essa abordagem farmacológica foi um grande avanço no tratamento da HPB, principalmente devido à melhor tolerabilidade por pacientes (MICHEL 2010, JELSKI & SPEAKMAN, 2012). Porém, dois fatores importantes de LUTS/HBP que não são modulados por antagonistas de AR- $\alpha_{1A}$  são o tamanho da próstata e hiperatividade do músculo detrusor (MCVARY e cols., 2011, OELKE e cols., 2013).

## **a.2. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT<sub>1A</sub>**

Ao nível molecular foi verificado que a maioria dos receptores 5-HT é metabotrópico e, portanto acoplada à proteína G (GPCR). E como dito anteriormente, eles pertencem principalmente à família *R* de GPCR, com exceção de um único membro da família, o receptor 5-HT<sub>3</sub>, que corresponde a um receptor ionotrópico (HUMPHREY e cols., 1993).

Na próstata existem células neuroendócrinas que produzem e secretam serotonina (5-HT) (ABRAHAMSSON e cols., 1986), Elas estão relacionadas com a patogênese da HPB, pois foi observada maior densidade destas células em pequenos nódulos em desenvolvimento e em ductos na zona de transição (COCKETT e cols., 1993; ISLAM e cols., 2002).

Receptores serotoninérgicos, subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, são expressos nas células prostáticas conforme observado tanto em biópsia de tecido de pacientes com HPB como em linhagens de células tumorais de próstata tais como LNCaP, DU-145 e PC-3, sugerindo um efeito autócrino da 5-HT (DIZEYI e cols., 2004).

A 5-HT secretada por células neuroendócrinas é reconhecida como fator de crescimento em vários tipos celulares incluindo células prostáticas (DIZEYI

e cols., 2004, SIDDIQUI e cols., 2006). Estudos sugerem o envolvimento da 5-HT no desenvolvimento da HPB, uma vez que estimula a atividade proliferativa das células epiteliais juntamente com outros fatores de crescimento, estimulando a mitogênese em fibroblastos e em musculatura lisa (COCKETT e cols., 1993; ISLAM e cols., 2002).

A ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> aumenta a proliferação de células da próstata, através da estimulação da via de Akt/MAPK (HSIUNG e cols., 2005, DIZEYI e cols., 2011). Por conseguinte, a inibição da atividade desse receptor, por tratamento com NAN190, por exemplo, reduz a proliferação de linhagens células de câncer de próstata *in vitro* (PC3, DU145 e LNCaP) (ABDUL e cols., 1994 e 1995; DIZEYI e cols., 2004 e 2005).

Desta forma, antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> apresentam efeitos anti-proliferativos (ABDUL e cols., 1994; DIZEYI e cols., 2004, SIDDIQUI e cols., 2006, FIORINO e cols., 2014). Fazendo com que este receptor acoplado a proteína G seja considerado como um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos com ação anti-proliferativa, tais como fármacos para o tratamento da HPB (CHAGAS-SILVA e cols, 2014)

### **C. PROPOSIÇÃO DE NOVA ABORDAGEM FARMACOLÓGICA PARA O TRATAMENTO DA HPB**

O tratamento da HPB pela utilização de antagonistas que possam, de maneira concomitante, relaxar o tecido prostático e retardar o aumento da próstata pode ser mais eficaz do que a monoterapia direcionada para o antagonismo de AR- $\alpha_{1A}$ , atualmente em uso clínico (MICHEL, 2010).

Tendo em vista as ações anti-proliferativas relacionadas ao AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, propomos neste estudo uma nova abordagem no campo de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da HPB. Esta nova abordagem corresponde à busca por antagonistas multi-alvos de AR- $\alpha_{1A/D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

### C.1. ESTRUTURA PRIVILEGIADA

Em química medicinal, estruturas químicas que têm esta capacidade de reconhecer diferentes receptores são chamados de estruturas privilegiadas. Tal termo começou a ser empregado no final da década de 80, visando explicar a habilidade de certas estruturas reconhecerem diferentes alvos (EVANS e cols., 1988).

Trata-se de “esqueletos moleculares” com propriedades versáteis de interação intermolecular, permitindo a interação de forma potente e seletiva com diferentes alvos moleculares (receptores) através da modificação de grupos funcionais (DESIMONE e cols., 2004). De fato a adoção desse novo conceito gerou um grande impacto no processo de desenvolvimento de novos fármacos, como pode ser notado pelo grande número de citações da expressão "Estruturas privilegiadas" em diferentes bancos de dados (DUARTE e cols., 2007).

Uma estrutura química que pode ser considerada como estrutura privilegiada é a subunidade de *N*-fenilpiperazina (Fig. 8) que representa um dos “esqueletos moleculares” mais versáteis utilizados no campo da química medicinal (MAIA e cols., 2012). Este arcabouço tem sido principalmente utilizado na concepção de compostos que são capazes de agir em vários receptores de aminas biogênicas, tais como vários subtipos de AR, receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos (SOSKIC & JOKSIMOVIC, 1998, LOPEZ-RODRIGUEZ e cols., 2002, ROSINI e cols., 2007).

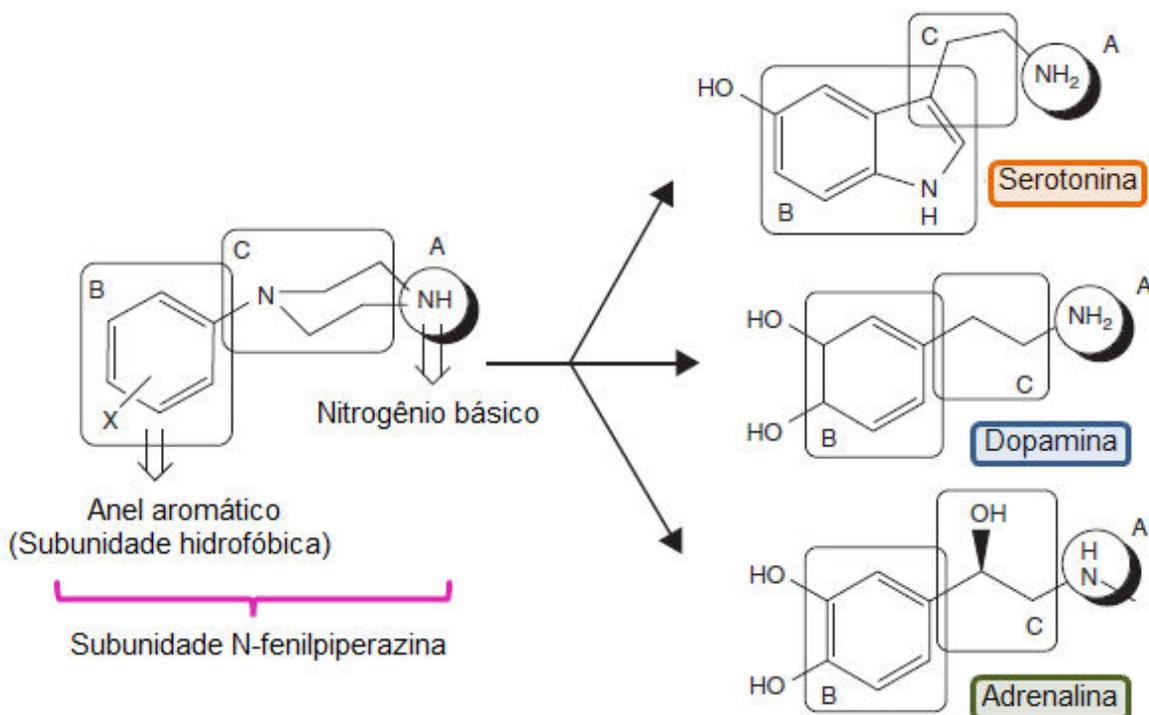


Figura 8. Pontos farmacofóricos e características de conformacionais (A – Nitrogênio básico; B - Anel aromático (ponto de interações hidrofóbicas); C – espaçador) da subunidade N-fenilpiperazina, e suas semelhanças com os neurotransmissores serotonina, dopamina e adrenalina. Adaptado a partir de MAIA e cols., 2012.

## C.2. NOVOS DERIVADOS N-FENILPIPERAZÍNICOS

Anteriormente, durante desenvolvimento de minha dissertação de mestrado, investigamos a relação estrutura-atividade de novas substâncias (série LDT 2-8), os quais compartilham a unidade farmacofórica N-fenilpiperazina (indicada pela seta vermelha) do BMY-7378 (ferramenta farmacológica, antagonista de AR- $\alpha_{1D}$ ) (Fig. 9A) e uma segunda subunidade farmacofórica benzodioxola (indicada pela seta azul) do LASSBio-772 (Fig. 9B) (ROMEIRO e cols., 2011), quanto aos seus efeitos nos AR- $\alpha_1$ .

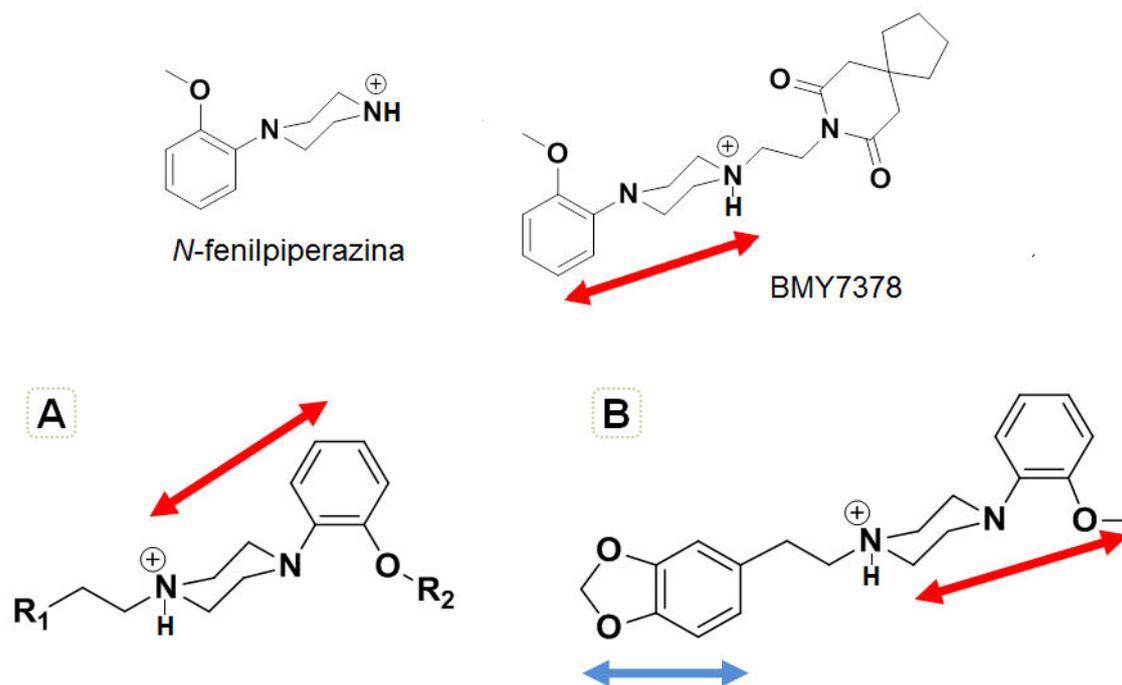
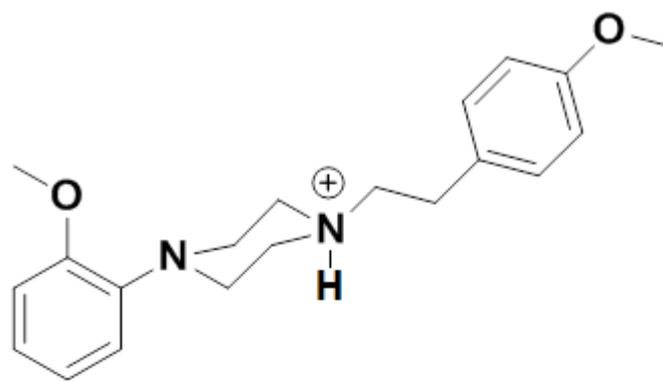
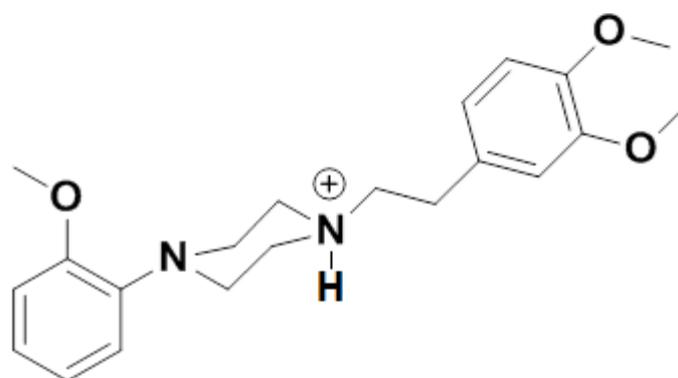


Figura 9. Parte superior: Estruturas da N-fenilpiperazina e BMY7378; Parte inferior: (A) Núcleo N-fenilpiperazínico dos LDTs. R1 e R2 representam substituintes no N<sub>4</sub> da piperazina e na posição 2 do anel aromático, respectivamente. (B) Estrutura química do LASSBio-772 (Romeiro e cols., 2011). A unidade farmacofórica N-fenilpiperazínica é identificada pela seta vermelha, e a unidade farmacofórica arílica é indicada pela seta azul.

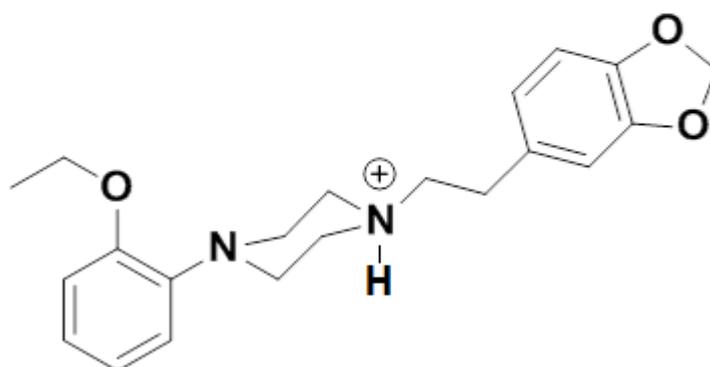
Nos estudos com a nova série, foram realizados inicialmente ensaios funcionais em aorta de rato e de radioligação (*binding*) em preparações de fígado de coelho e rato, tecidos estes enriquecidos em AR- $\alpha_{1D}$ , AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1B}$  nativos, respectivamente. Além disso, avaliamos a afinidade por receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Nesta primeira etapa dos estudos destacaram-se LDT3, LDT5 e LDT8 (Fig. 10), os quais apresentaram elevada afinidade (faixa nM) por AR- $\alpha_{1A/D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub> (tabela 1). Enquanto que apresentaram menores afinidades por receptores AR- $\alpha_{1B}$  e receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> (tabela 2).



LDT3



LDT5



LDT8

Figura 10: Estruturas moleculares dos LDT3, LDT5 e LDT8 (PCT/BR2013/00003)

Tabela 1. Valores de  $K_i$  ou  $K_B$  para os AR- $\alpha_{1A/D}$  e receptores 5-HT $_{1A}$ . (Nascimento, 2011, PCT/BR2013/00003)

	LDT3			LDT5			LDT8		
	AR			AR			AR		
	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1D}$	5-HT $_{1A}$	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1D}$	5-HT $_{1A}$	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1D}$	5-HT $_{1A}$
<b><math>K_i</math> ou <math>K_B</math> (nM)</b>	4,63	1,95	1,2	3,67	0,59	2,5	3,76	0,18	0,02

Tabela 2. Valores de  $K_i$  para os AR- $\alpha_{1B}$  e receptores 5-HT $_{2A}$ . (Nascimento, 2011, PCT/BR2013/00003)

	LDT3		LDT5		LDT8	
	AR- $\alpha_{1B}$	5-HT $_{2A}$	AR- $\alpha_{1B}$	5-HT $_{2A}$	AR- $\alpha_{1B}$	5-HT $_{2A}$
<b><math>K_i</math> (nM)</b>	73	45	12	248	9,07	254

Desta forma, LDT3, LDT5 e LDT8 podem constituir novos antagonistas multi-alvos (AR- $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$ ) e receptores 5-HT $_{1A}$ ), os quais podem ser potencialmente úteis não só no alívio dos sintomas da HPB mas também para inibir a proliferação do tecido prostático. E por esses motivos foram eleitas para dar continuidade ao projeto, sendo objeto de estudo desta tese de doutorado.

*Objetivo*

---

## **II. A. OBJETIVOS GERAIS**

Caracterizar farmacologicamente três derivados *N*-fenilpiperazínicos, LDT3, LDT5 e LDT8, selecionados anteriormente por serem antagonistas de AR- $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1D}$ , além de apresentarem altas afinidades por estes receptores e receptores 5-HT $_{1A}$ , determinando suas atividades intrínsecas por estes receptores. Verificar se tais afinidades seriam reproduzidas em modelos de receptores humanos, avaliando a seletividade e capacidade antiproliferativa destes compostos na busca de novos candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da hiperplasia prostática benigna.

## **II. B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliação teórica das propriedades moleculares dos LDTs

### **B. 1. Em material/modelo animal**

- ✓ Determinar de afinidade e atividade intrínseca para AR- $\alpha_{1A}$
- ✓ Determinar da seletividade dos LDTs pela verificação de afinidades por receptores não-alvo (AR- $\alpha_2$ , receptores muscarínicos e dopaminérgicos (D $_2$ -“like”))
- ✓ Determinar de atividade intrínseca para receptores 5-HT $_{1A}$
- ✓ Determinar de possíveis efeitos tóxicos após administração de dose única dos LDTs *in vivo*
- ✓ Determinar dos efeitos dos LDTs em modelo de pressão intrauretral elevada por via adrenérgica, *in vivo*
- ✓ Determinar dos efeitos do LDTs sobre a pressão arterial média em animal anestesiado

### **B. 2. Em material humano**

- ✓ Determinar de afinidade dos LDTs por AR- $\alpha_1$  humanos em células transfectadas com tais receptores
- ✓ Determinar o efeito antiproliferativo dos LDTs utilizando células humanas (linhagem de célula prostática tumoral DU-145 e linhagem primária de células provenientes de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna)
- ✓ Determinar possíveis efeitos citotóxicos dos LDTs

*Material & Métodos*

---

### III. A. NOVOS DERIVADOS *N*-FENILPIPERAZÍNICOS

#### III. A. 1. OBTENÇÃO

Todos os derivados, denominados LDTs, foram sintetizados pela equipe do professor Luiz Antonio Soares Romeiro (laboratório LADETER, Universidade Católica de Brasília), com rendimentos que variaram de 86 a 97%, e foram disponibilizados sob forma sólida de monoclорidratos com posterior solubilização à concentração de 10 mM em água ultrapura e estoque a -20°C.

Os LDTs foram caracterizados através de espectros de infra-vermelho com transformada de Fourier (FT-IR) em um espectrômetro Perkin Elmer (Spectrum BX) (Anexo 1), espectros de <sup>1</sup>H-RMN (300 e 500 MHz CDCl<sub>3</sub>) e de <sup>13</sup>C-RMN (75 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) em Varian Plus (7,05 T) e espectrômetros Bruker Avance DRX500 e DRX300 (Anexo 1), e espectros de massa registrados em espectrômetro Shimadzu LCMS IT-TOF.

A pureza foi determinada por cromatografia de camada delgada eluída com mistura de solventes polar e apolar (etanol/clorofórmio) mostrando apenas uma única mancha (*spot*).

A cada dia de experimento, foram diluídas pequenas alíquotas da solução estoque em concentrações necessárias para a realização do experimento em questão.

#### III. A. 2. AVALIAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DOS LDTs

##### III. A. 2.a. “REGRA DOS CINCO” DE LIPINSKI (RO5)

Segundo Lipinski e cols. (1997), para assegurar uma boa biodisponibilidade oral, um fármaco deveria satisfazer a quatro critérios associados com a solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, são eles:

- i)* apresentar até 5 doadores de ligação hidrogênio;
- ii)* apresentar até 10 aceptores de ligação hidrogênio;
- iii)* possuir massa molecular menor que 500 Da;
- iv)* LogP menor que 5.

Essa condição é conhecida como “Regra dos Cinco”, uma vez que para cada um dos quatro parâmetros, os valores encontrados correspondem a cinco ou a seus múltiplos (LIPINSKI, 2004). Tal regra serve como um guia qualitativo para predizer se as moléculas apresentarão boa absorção e permeabilidade.

As propriedades moleculares dos LDTs foram calculadas através do uso do programa Advanced Chemistry Development, inc. software acd/Percepta versão 14.0.0 (Build 2254), módulo Physchem.

### III. A. 2.b. EFICIÊNCIA DO LIGANTE

Um parâmetro que tem tido seu uso bastante difundido no contexto de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é a *Eficiência do Ligante* (EL). Este corresponde à energia de ligação por átomo de um ligante ao seu receptor.

A EL foi obtida utilizando dados da atividade biológica *in vitro* (valores de pKi obtidos em ensaios de *binding*) corrigido pelo número de átomos não-hidrogênio (isto é, carbono, nitrogênio, oxigênio), normalizando assim a atividade relativa com o tamanho da molécula (HOPKINS e cols., 2014):

(Equação 1)

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

### III. B. OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS

Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da UFRJ (CEUA; protocolo: DFBCICB011).

Ratos Wistar machos de 2,5 – 3 meses foram eutanasiados por decaptação após serem anestesiados em câmara saturada com éter. Para os ensaios funcionais de contração isométrica, as tiras de próstata foram removidas e manipuladas em solução fisiológica como descrito em **III.C.1** (PICARELLI e cols.,1962). Para os ensaios de ligação, após o sacrifício dos animais, o tecido a ser utilizado foi rapidamente removido. Os cérebros foram

cuidadosamente dissecados sobre placa de gelo, para obtenção das seguintes estruturas: córtex, estriado e hipocampo. Os tecidos obtidos foram então armazenados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) até a preparação do homogeneizado seguindo protocolo descrito anteriormente (NEVES e cols., 2010, CHAGAS-SILVA e cols., 2014; NOËL e cols., 2014).

### **III. C. SOLUÇÕES UTILIZADAS**

#### **1. ENSAIO FUNCIONAL**

✓ Solução fisiológica

NaCl	138 mM
KCl	5,7 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36 mM
NaHCO <sub>3</sub>	15 mM
Glicose	5,5 mM

✓ Solução de potássio despolarizante

KCl	60 mM
-----	-------

#### **2. ENSAIO DE BINDING COMPETITIVO**

##### **2. A. PREPARAÇÃO DE PROTEÍNA**

✓ Solução de armazenamento e descongelamento (Solução "1")

Sacarose	0,25 M
EGTA	1 mM
Tris	5 mM
HCl	1N até pH 7,2, a 25°C

✓ Solução para homogeneização de fígado de rato (Solução "2")

EDTA	2 mM
NaCl	100 mM
Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,2, a 25°C

✓ Solução tampão (Solução "3")

EDTA	1 mM
Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,2, a 25°C

✓ Solução tampão (Solução "4")

Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,4, a 37°C

✓ Solução tampão para homogeneização e armazenamento de estriado, córtex e hipocampo de rato (Solução "5")

Tris	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	8 mM
EDTA	5 mM
HCl	1N até pH 7,4, a 37°C ou 4°C

**2. B. MEIOS DE INCUBAÇÃO PARA EXPERIMENTOS DE BINDING**

✓ Adrenoceptores  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR)

[ <sup>3</sup> H]-RX821002	1,0 nM
Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,4, a 25°C

✓ Receptores *muscarínicos*

[ <sup>3</sup> H]-QNB	0,1 nM
Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,4, a 37°C

✓ Receptores Dopaminérgicos ( $D_2$ -Like)

[ <sup>3</sup> H]-YM-09151-2	0,1 nM
NaCl	120 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
EDTA	1 mM
Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,2, a 25°C

✓ Receptores Serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>

[ <sup>3</sup> H]-p-MPPF	0,5 nM
NaCl	120 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5mM
EDTA	1 mM
Tris	50 mM
HCl	1N até pH 7,2, a 25°C

**2. C. SOLUÇÃO DE LAVAGEM**

✓ Adrenoceptores  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -AR), receptores muscarínicos e dopaminérgicos ( $D_2$ -Like)

Tris	5 mM
HCl	1N até pH 7,4, a 25°C

**2. D. LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO**

PPO	4 g
POPOP	0,1 g
Tolueno	1 L

**3. TAMPÃO PARA ENSAIO DE MEDIDA DE CÁLCIO INTRACELULAR**

HEPES	20 mM
NaCl	120 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
KCl	4,75 mM
Glicose	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM
BSA	0,05%
HCl	1N até pH 7,4, a 25°C

**4. TAMPÃO RIPA**

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P40	1%
HCl	1N até pH 7,4, a 25°C

**III.D. RADIOLIGANTES E FÁRMACOS UTILIZADOS**

Os radioligantes: [<sup>3</sup>H]-RX821002 (atividade específica 60 Ci/mmol - PerkinElmer, EUA), [<sup>3</sup>H]-QNB (atividade específica 48 Ci/mmol – Amersham, UK), [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (atividade específica 82,7 Ci/mmol - Amersham (UK)). Cloridrato de prazosina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina, cloridrato de acetilcolina, cloridrato de (R)-(-)-fenilefrina, bitartarato de adrenalina, cloridrato de (±)-propranolol, foram comprados da SIGMA, EUA. Cloridrato de BMY7378, cloridrato de (R)-tansulosina e a (R,S)-(±)- sulpirida foram adquiridas da Tocris Bioscience (EUA). E, (-)-epinefrina e CRM197 foram comprados da Sigma, São Paulo, Brasil. Soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina, tripsina e EGF foram comprados da Gibco/lifetechnologies; AG1478, GM6001 e PD98059 da Calbiochem.

### III. E. ENSAIOS FUNCIONAIS

#### III.E.1. CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA – TIRAS DE PRÓSTATA

Como descrito por NANDA e colaboradores (2009), realizou-se ensaios de contração isométrica utilizando ratos Wistar machos, com idade de 2,5 – 3 meses eutanasiados como descrito anteriormente. A próstata (tecido enriquecido em receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos funcionais) (SCOFIELD e cols., 1995) foi removida, livre dos tecidos conectivos adjacentes, e a parte ventral foi cortada em segmentos (tiras) de 10 mm.

Em seguida, cada tira foi fixada a um transdutor de tensão (GRASS FT-03), e mergulhada em cuba contendo 9 ml de solução fisiológica, mantida a 37°C sob constante aeração com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) (Fig. 11). Os segmentos da próstata foram então submetidos a uma pré-carga de 10 mN por 60 minutos, com troca da solução de lavagem a cada 20 minutos.

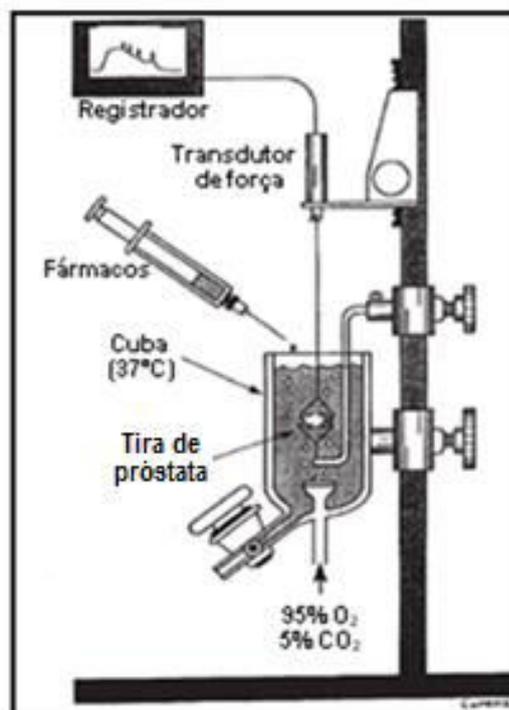


Figura 11: Representação esquemática do sistema de órgão isolado onde realizou-se ensaios funcionais com próstata de rato (modificado de EVORA e cols., 1999).

Inicialmente, foram induzidas duas contrações com solução de KCl 60 mM para obtenção de contrações reprodutíveis. Em seguida a preparação foi lavada e mantida em repouso por 45 minutos, visando a recuperação do tecido. Foram então realizadas curvas cumulativas à fenilefrina (FE) ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$ M) (agonista seletivo dos  $\alpha_1$ -adrenoceptores) na presença de propranolol 0,1  $\mu$ M (antagonista dos  $\beta$ -adrenoceptores), com intervalo de 1 hora entre cada curva. As curvas foram realizadas antes e após a incubação por 1 hora com os LDTs (10 nM), ou com tansulosina (10 nM) (antagonista seletivo dos  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptores).

Paralelamente, um controle temporal foi realizado para descartar a existência de algum artefato sobre a contração medida, onde adicionou-se apenas o veículo (água ultrapura Milli Q<sup>®</sup>) no lugar da substância a ser testada.

Os dados foram digitalizados no sistema MacLab 8S conectado ao transdutor de tensão isométrico Grass FT-03, que registrou a variação de tensão em miliNewtons (mN) gerada ao longo do ensaio. Os dados digitalizados foram então analisados através do programa Chart 3.4/s (MacLab, Inc., EUA).

Desta forma, através da construção de curvas concentração-resposta ao agonista FE na ausência e presença do antagonista pode-se determinar os parâmetros de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e concentração que promove 50% do  $E_{max}$  ( $CE_{50}$ ). A razão entre o valor de  $CE_{50}$  nestas duas condições corresponde a um terceiro parâmetro, denominado “razão da concentração” (ou CR), conforme mostrado na figura 12.

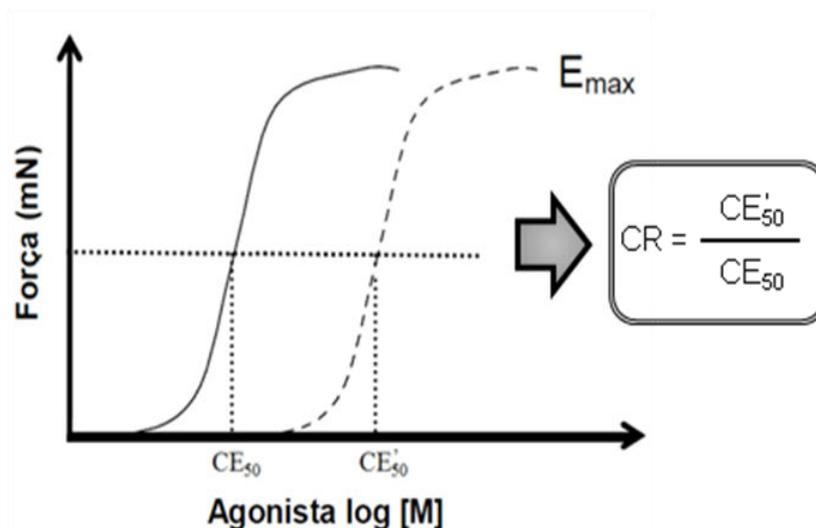


Figura 12: Curva concentração-resposta teórica do agonista na ausência (linha contínua) e presença do antagonista superável (linha pontilhada).

Uma vez determinado estes parâmetros, a afinidade aparente dos antagonistas ( $K_B$ ) *in vitro* foi calculada usando-se a equação de Gaddum (Eq. 2), válida para antagonistas competitivos reversíveis (KENAKIN, 1993).

(Equação 2)

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

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

### III. F. ENSAIOS DE LIGAÇÃO (*BINDING*)

Para todos os ensaios de *binding* realizamos inicialmente os ensaios de saturação, onde medimos a ligação do radioligante específico ao receptor estudado: o [ $^3$ H]-RX821002 para os AR- $\alpha_{2A}$ , o [ $^3$ H]-QNB para os receptores muscarínicos, e o [ $^3$ H]-YM-09151-2 para os receptores D<sub>2</sub>-“like”.

Utilizando preparações membranares de tecidos enriquecidos em cada um dos receptores estudados, realizamos ensaios na ausência e presença de diferentes concentrações de um ligante não radioativo (por exemplo,  $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  M). Os dados obtidos no ensaio de saturação nos permitem obter os

parâmetros  $K_d$  (constante de dissociação), a qual representa a concentração de radioligante necessária para ocupar 50% dos sítios receptores, e  $B_{max}$ , densidade máxima dos sítios de ligação, os quais foram calculados por regressão não-linear. Como mostrado na figura 13, o eixo da abscissa contém as concentrações molares crescentes do ligante não radioativo, e no eixo da ordenada os valores de *bound*, ou seja ligação específica do ligante radioativo ao receptor. Os valores crescentes de *bound* foram calculados indiretamente. O valor de *bound* (fmol/mg proteína) obtido com o radioligante (ex:  $^3\text{[H]}$ -prazosina) foi multiplicado por um fator de diluição (FD) decorrente da adição do ligante não radioativo (ex: prazosina) ao meio contendo o radioligante (Eq. 2), em processo conhecido como diluição isotópica. Este procedimento visa obter uma curva de saturação com menor gasto de substância radioativa e de material biológico.

(Equação 2)

$$FD = \frac{[\text{ligante}] + [\text{radioligante}]}{[\text{radioligante}]}$$

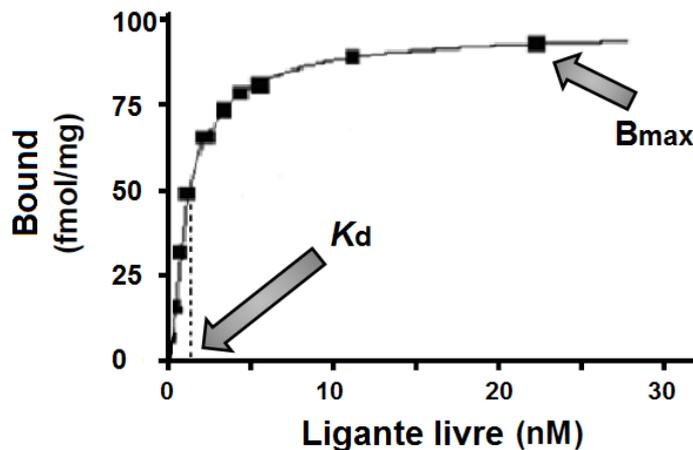


Figura 13: Curva teórica de saturação

Ensaio de competição nos permitem construir curvas de inibição da ligação específica do radioligante (Fig. 14). Havendo afinidade do agente competidor pelo receptor, quanto maior for a concentração empregada do competidor, neste caso os LDTs, maior será a competição pelos receptores específicos e inibição da ligação do radioligante ao seu receptor. Isto pode ser observado pela progressiva redução da radioatividade retida nos filtros e detectada pelo contador de cintilação líquida.

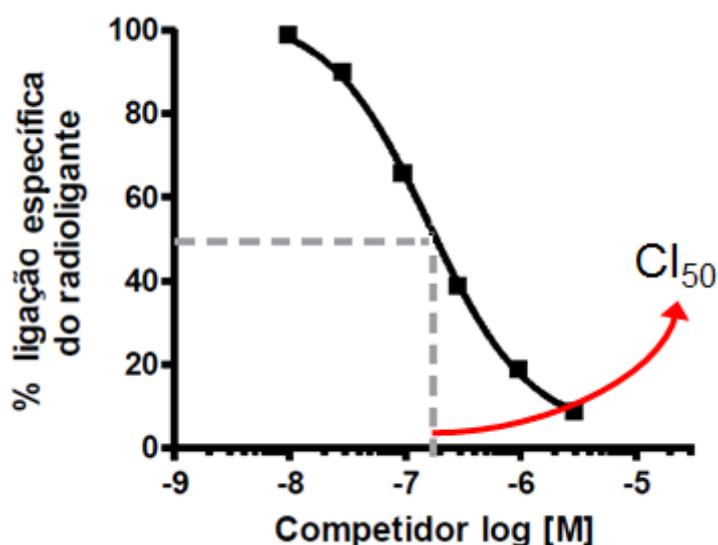


Figura 14: Curva teórica de competição

A partir destas curvas de inibição foi possível calcular os valores de concentração de LDT que inibem em 50% a ligação do radioligante ( $CI_{50}$ ). Tais valores foram convertidos a valores de  $K_i$  (constante de dissociação do competidor no equilíbrio ou constante de inibição) através da equação de Cheng-Prusoff (Eq. 3) (CHENG & PRUSOFF, 1973).

(Equação 3)

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

Onde  $K_i$  = constante de inibição;  $CI_{50}$  = concentração que inibe em 50% a ligação do radioligante;  $[L]$  = concentração do radioligante;  $K_d$  = constante de equilíbrio de dissociação do radioligante (medido em ensaio de saturação).

## 1. ADRENOCEPTORES $\alpha_{2A}$

### 1. A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR

Seguindo o protocolo previamente descrito por NEVES e colaboradores (2010), foram obtidas preparações membranares de homogeneizado de córtex de rato. Tais preparações membranares são enriquecidas no subtipo AR- $\alpha_{2A}$  (HANDY E COLS., 1993).

Os órgãos foram homogeneizados em Potter com o auxílio de um aparelho motorizado (Fisatom) e pistão de *teflon*, na proporção de 10 partes de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 a 4°C) para 1 parte de material, por três vezes durante 30 segundos cada vez. Nos intervalos a solução ficou em repouso por 1 minuto em gelo.

Em seguida realizou-se uma centrifugação a 900 x *g*, por 10 minutos a 4°C, onde se obteve um *pellet* que foi ressuspenso em solução Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelada e o mesmo procedimento foi realizado mais uma vez. O sobrenadante foi então centrifugado a 48.000 x *g*, por 10 minutos a 4°C, obtendo-se um *pellet* que foi ressuspenso na proporção de 20 partes de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 a 4°C) para 1 parte de material, e incubado a 37°C por 10 minutos, a fim de se remover os neurotransmissores endógenos. Por fim, foi realizada a centrifugação por mais duas vezes a 48.000 x *g*, por 10 minutos a 4°C, e então o *pellet* final foi ressuspenso em solução de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) (Fig. 15) e estocado em alíquotas de 300  $\mu$ L em nitrogênio líquido.

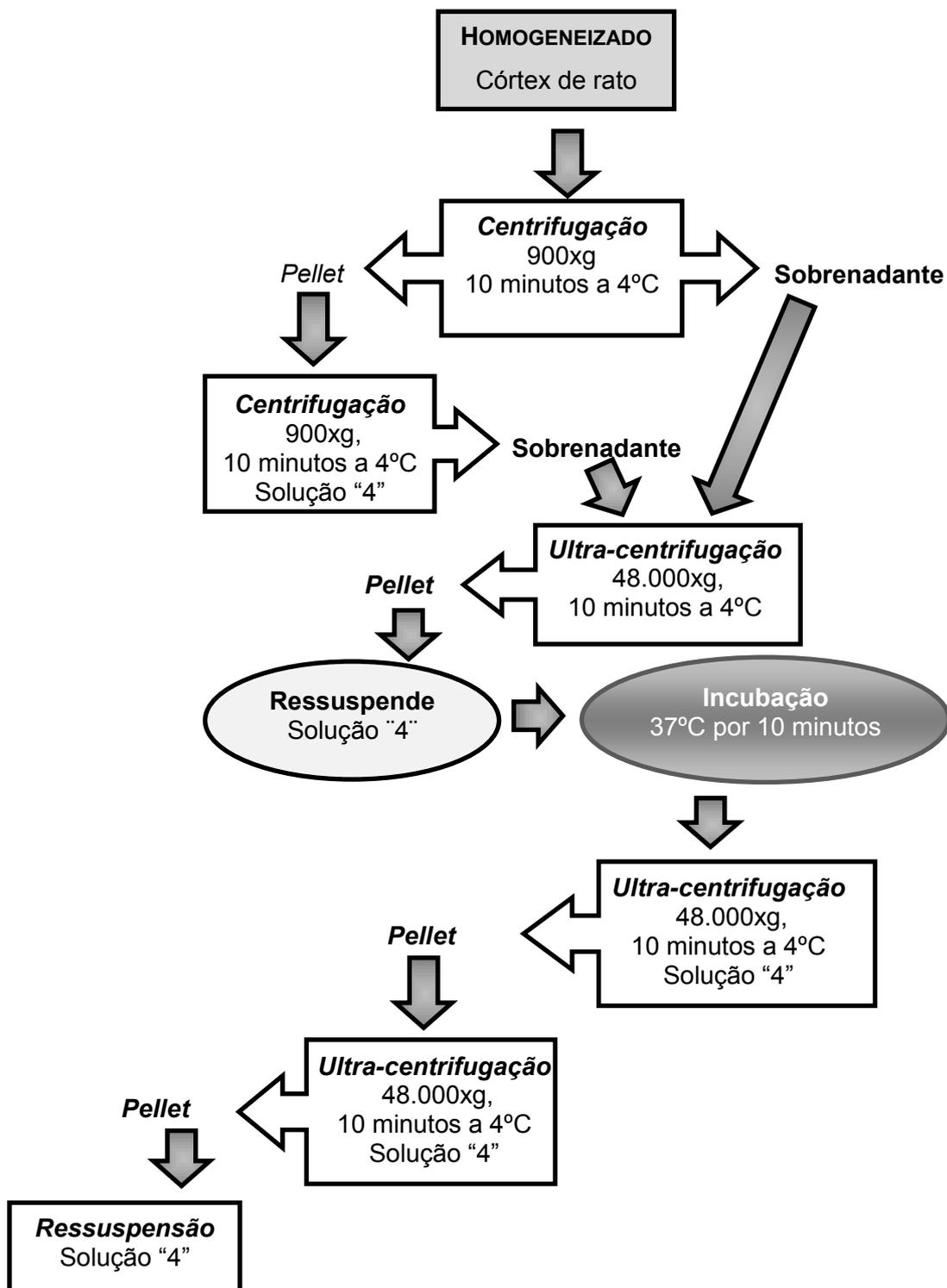


Figura 15: Organograma de preparação membranar de córtex de rato (AR- $\alpha_{2A}$ )

Em todos os protocolos de preparações membranares a dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de LOWRY e cols. (1951). Ver adiante em **III.F.5**.

### **1. B. BINDING DO [<sup>3</sup>H]-RX821002 AOS RECEPTORES AR- $\alpha_{2A}$**

Nos ensaios de saturação foi medida a ligação do [<sup>3</sup>H]-RX821002 aos AR- $\alpha_2$  na ausência e presença de concentrações crescentes (0,03 – 10 nM) de RX821002 não radioativo. Os ensaios de competição foram realizados de acordo com o descrito anteriormente (UHLÉN e cols., 1991). Em tubos de ensaio contendo 350  $\mu$ L de solução intermediária contendo radioligante (ver sessão **III.C.2.B**) foram adicionados 50  $\mu$ L de diferentes concentrações de LDTs (concentração final  $3 \times 10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-5}$  M), ou 50  $\mu$ L de água (veículo para a diluição dos LDTs), para a determinação da ligação total; ou 50  $\mu$ L de bitartarato de adrenalina (100  $\mu$ M) para a determinação da ligação não-específica, além de 150  $\mu$ g de proteína das preparações membranares de córtex de rato (AR- $\alpha_{2A}$ ) contidos em 50  $\mu$ l de suspensão completando volume final de 500  $\mu$ L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em ambos ensaios, as preparações membranares, em solução intermediária contendo os ligantes, foram incubadas a 30°C por 60 minutos.

Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução de lavagem gelada (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4), seguida por filtração rápida à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak<sup>®</sup>) umedecidos em 0,5% polietileneimina. Os filtros foram lavados duas vezes com 4 mL da mesma solução sob vácuo para remover todo o radioligante livre. Em seguida os filtros foram secos e acondicionados em *vials* contendo 5 mL de líquido de cintilação (PPO 4%, POPOP 0,1% em tolueno). A radioatividade retida nos filtros foi então determinada em contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR). Este procedimento de parada da reação e filtração foi o mesmo para todos os três ensaios de *binding* realizados neste estudo (AR- $\alpha_{2A}$ , receptores muscarínicos e D<sub>2</sub>-“like”).

Os parâmetros  $Cl_{50}$  e  $K_i$  foram determinados como descrito anteriormente (**III.F.**),

A ligação específica do [<sup>3</sup>H]-RX821002 aos AR- $\alpha_{2A}$  foi definida como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica.

## **2. RECEPTORES MUSCARÍNICOS**

### **2. A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR**

Foram realizadas preparações membranares de córtex de rato de acordo com o descrito anteriormente por RICHARDS, e cols. (1990) e CASTOLDI e cols (2006).

As etapas de homogeneização e centrifugação foram realizadas de maneira idêntica à descrita anteriormente para receptores AR- $\alpha_{2A}$  (Fig. 15).

### **2. B. BINDING DO [<sup>3</sup>H]-QNB AOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS**

Os ensaios de competição foram realizados de acordo com o descrito anteriormente (RICHARDS, 1990; CASTOLDI e cols., 2006). A tubos de ensaio contendo 350  $\mu$ L de solução intermediária intermediária contendo radioligante (ver sessão **III.C.2.B**), foram adicionados 50  $\mu$ L de diferentes concentrações de LDTs (concentração final  $3 \times 10^{-6}$  -  $10^{-3}$  M), ou 50  $\mu$ L de água (veículo para a diluição dos LDTs), para a determinação da ligação total, ou 50  $\mu$ L de sulfato de atropina (10  $\mu$ M) para a determinação da ligação não-específica, além de 150  $\mu$ g das preparações membranares de córtex de rato (receptores muscarínicos) contidos em 50  $\mu$ l de suspensão completando volume final de 500  $\mu$ L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As preparações membranares, em solução intermediária contendo os ligantes, foram incubadas a 25°C por 60 minutos.

O procedimento de parada da reação e filtração foi o mesmo descrito em **III.F.1.B.**

Os parâmetros  $Cl_{50}$  e  $Ki$  foram determinados como descrito anteriormente (**III.F.**), porém assumiu-se o valor de  $Kd$  igual a 0,05 nM para [<sup>3</sup>H]-QNB (LUTHIN & WOLFE, 1984).

A ligação específica do [<sup>3</sup>H]-QNB aos receptores muscarínicos foi definida como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica.

### 3. RECEPTORES D<sub>2</sub>-“LIKE” NATIVOS

#### 3. A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR

Conforme descrito anteriormente, foram obtidas preparações membranares de homogeneizado de estriado de rato, enriquecidas nos subtipos de receptores dopaminérgicos: D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (D<sub>2</sub>-“like”) (NIZNIK e cols., 1985; TERAJ e cols., 1989; HAMDJ e cols., 1992; ASSIÉ e cols., 1993).

Os órgãos foram homogeneizados em Potter com o auxílio de um aparelho motorizado (Fisatom) e pistão de *teflon*, na proporção de 20 partes de Solução “5” (ver sessão III.C.2.A) para 1 parte de material, por três vezes durante 30 segundos cada vez. Nos intervalos a solução ficou em repouso por 1 minuto em gelo.

Em seguida realizou-se uma centrifugação a 48.000 x g, por 20 minutos a 4°C, onde se obteve um *pellet* que foi ressuspense em solução “5” (ver sessão III.C.2.A). Posteriormente, manteve-se sob incubação em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, a fim de se remover os neurotransmissores endógenos. Essa suspensão foi submetida a uma centrifugação a 48.000 x g, por 20 minutos a 4°C. Por fim, o *pellet* foi então ressuspense em solução “5” (ver sessão III.C.2.A) e submetido a mais uma centrifugação a 48.000 x g, por 20 minutos a 4°C, e então o *pellet* final foi ressuspense em solução “5” (ver sessão III.C.2.A) (Fig. 16) e estocado em alíquotas de 300 µL em nitrogênio líquido.

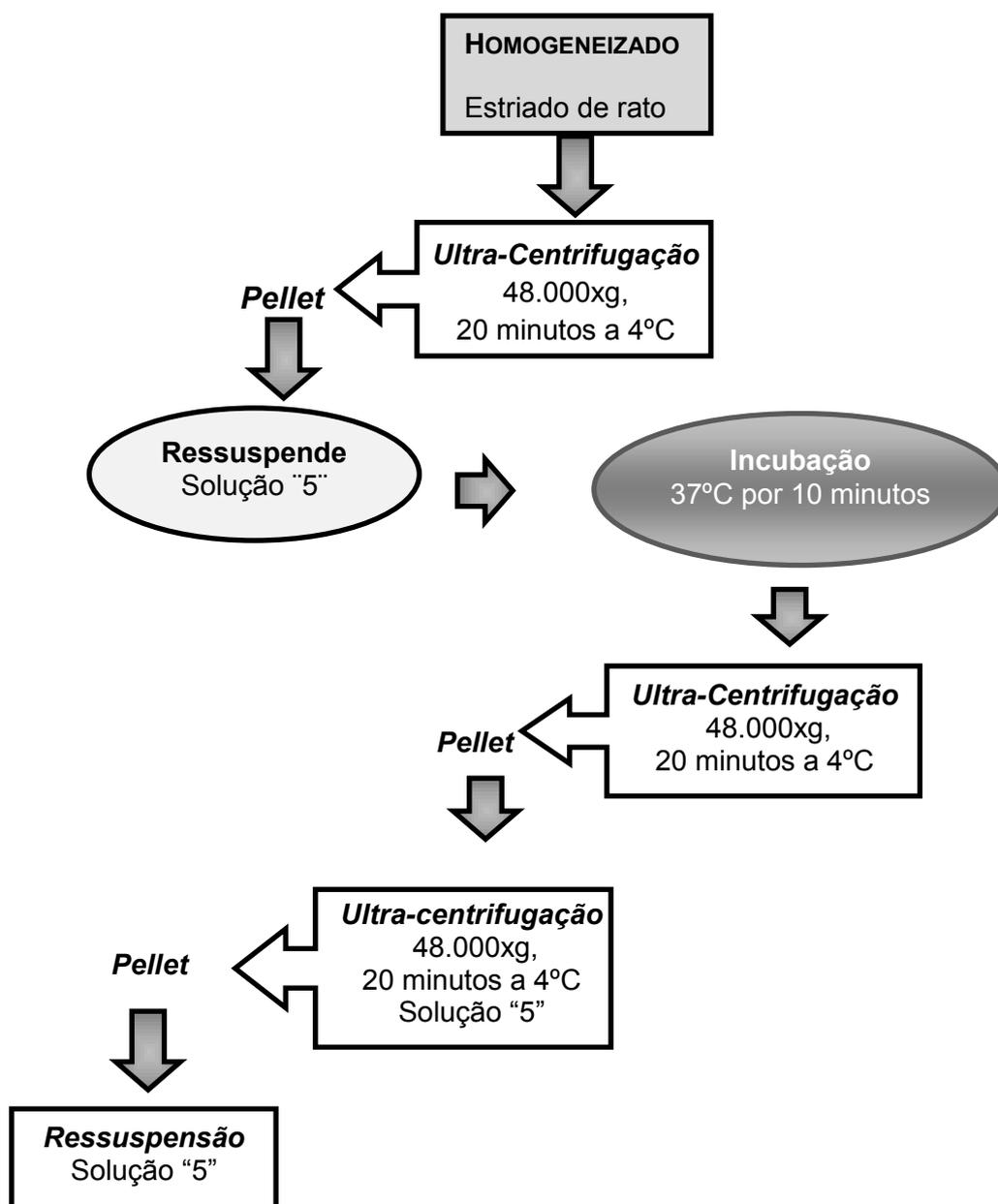


Figura 16: Organograma de preparação membranar de estriado de rato (receptores D<sub>2</sub>-“like”)

### 3. B. BINDING DO [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 AOS RECEPTORES D<sub>2</sub>-“LIKE”

Para ensaios de saturação foi medida a ligação do [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 aos receptores D<sub>2</sub>-“like” na ausência e presença de concentrações crescentes (0,03–3 nM) de ligante não radioativo. Os ensaios de competição foram realizados de acordo com o descrito anteriormente (NIZNIK e cols., 1985; TERAJ e cols., 1989; HAMDJ e cols., 1992; NEVES e cols., 2010). A tubos de ensaio contendo 350 µL de solução intermediária contendo radioligante (ver

sessão III.C.2.B), são adicionados 50 µL de diferentes concentrações de LDTs (concentração final  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M), ou 50 µL de água (veículo para a diluição dos LDTs), para a determinação da ligação total, ou 50 µL de sulpirida (30 µM), para a determinação da ligação não-específica, além de 50 µg das preparações membranares de estriado de rato ( $D_2$ -“like”) contidos em 50 µl de suspensão completando volume final de 500 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em ambos ensaios, as preparações membranares, em solução intermediária contendo os ligantes, foram incubadas a 37°C por 60 minutos.

Os parâmetros  $CI_{50}$  e  $K_i$  foram determinados como descrito anteriormente (III.F.).

A ligação específica do [ $^3$ H]-YM-09151-2 aos receptores  $D_2$ -“like” foi definida como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica.

#### 4. RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> – PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INTRÍNSECA

##### 4. A. PREPARAÇÃO MEMBRANAR

Foram realizadas preparações membranares de hipocampo de rato de acordo com o descrito anteriormente por HALL e cols. (1985) e PEROUTKA (1986) e NEVES e cols. (2010).

Os órgãos foram homogeneizados em Potter com o auxílio de um aparelho motorizado (Fisatom) e pistão de *teflon*, na proporção de 20 partes de Tris HCl 50 mM (pH 7,4 a 4°C) para 1 parte de material, por três vezes durante 30 segundos cada vez, nos intervalos a solução ficou em repouso por 1 minuto em gelo.

Em seguida realizou-se uma centrifugação a 900 x g, por 10 minutos a 4°C, onde se obteve um *pellet* que foi ressuspenso em solução Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado e o mesmo procedimento foi realizado mais uma vez. O sobrenadante foi então centrifugado a 48000 x g, por 10 minutos a 4°C, obtendo-se um *pellet* que foi ressuspenso na proporção de 20 partes de Tris HCl 50 mM (pH 7,4 a 4°C) para 1 parte de material, e incubado a 37°C por 10 minutos, a fim de se remover os neurotransmissores endógenos. Por fim, foi realizada a centrifugação por mais duas vezes a 48000 x g, por 10 minutos a

4°C, e então o *pellet* final foi ressuspensão em solução de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) (Fig. 17).

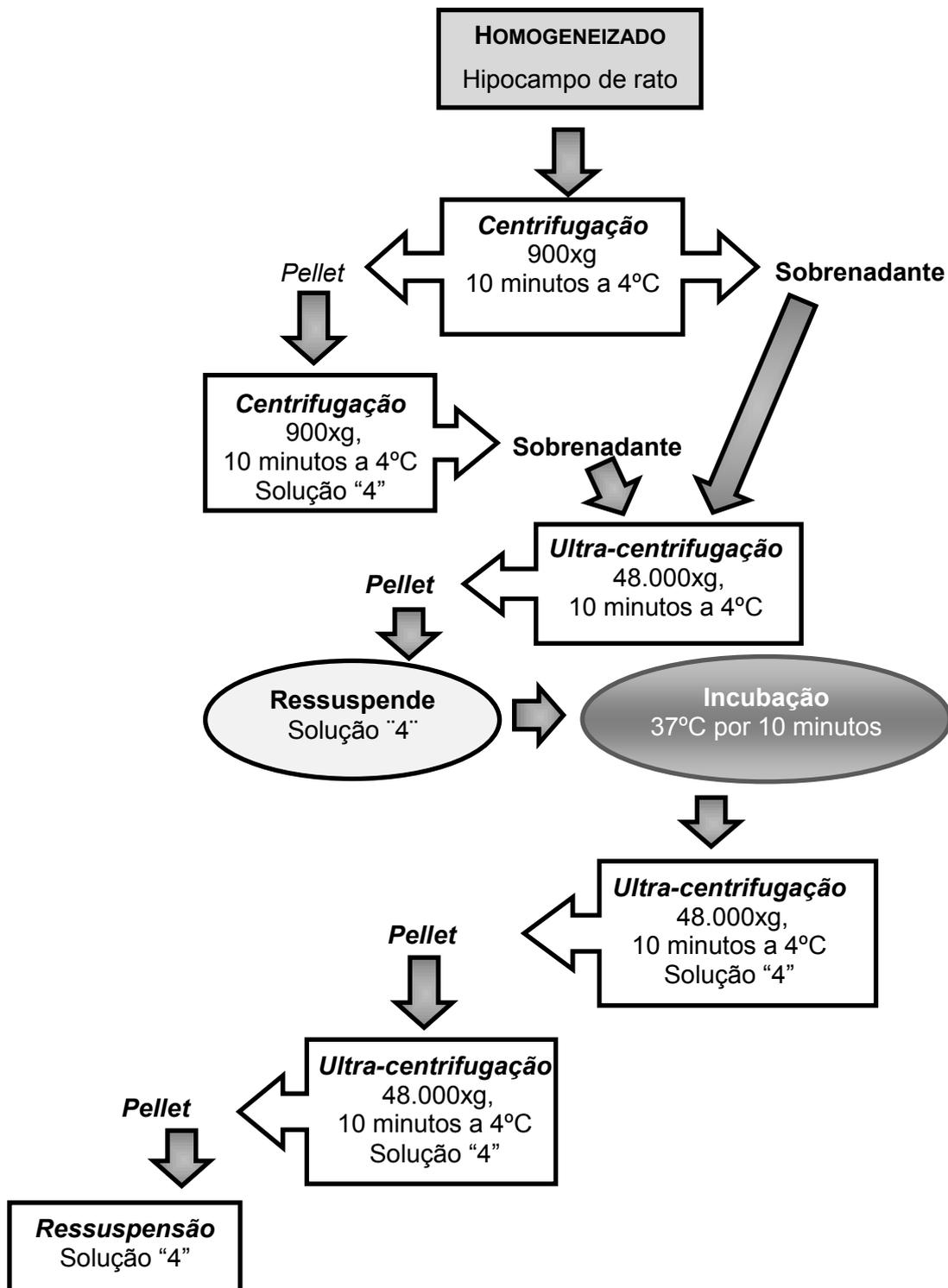


Figura 17: Organograma de preparação membranar de hipocampo de rato (receptores 5-HT<sub>1A</sub>)

**4. B. BINDING DO [3H]-p-MPPF AOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>  
(RADIOLIGANTE ANTAGONISTA)**

Os ensaios de ligação para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> utilizando radioligante antagonista ([<sup>3</sup>H]-p-MPPF) foram realizados de acordo com o descrito anteriormente (KUNG e cols., 1996; ASSIÉ e cols., 1999; NOËL e cols., 2014).

Incubou-se, por 45 minutos a 37°C, 75 µg de preparação membranar de hipocampo de rato, contidos em 50 µL de suspensão em Tris-HCl 50mM, em tubos contendo 400 µL de solução intermediária [<sup>3</sup>H]-p-MPPF 0,5 nM, na presença de GTP (1,0 mM), para garantir que todos os receptores se encontrassem no estado inativado/desacoplado (LAHTI e cols., 1992; NOËL e cols., 2014), além de 50 µL de diferentes concentrações de LDTs (concentração final 3x10<sup>-10</sup> – 3x10<sup>-8</sup> M para LDT 3; 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-7</sup> M para LDT 5; e 10<sup>-11</sup> – 3x10<sup>-9</sup> M para LDT 8), ou 50 µL de água (veículo para a diluição dos LDTs), para a determinação da ligação total, ou 50 µL de serotonina não radioativa a 10 µM para a determinação da ligação não-específica (volume final de 500 µL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

O procedimento de parada da reação e filtração foi o mesmo descrito em **III.F.1.B.**

A ligação específica do [<sup>3</sup>H]-p-MPPF aos receptores 5-HT<sub>1A</sub> foi definido como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica.

Para estes receptores também foram determinados os parâmetros CI<sub>50</sub> e K<sub>i</sub> como descrito em **III. E. 1. B.**

**4. C. BINDING DO [3H]-8-OH-DPAT AOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>  
(RADIOLIGANTE AGONISTA)**

As afinidades dos derivados LDT 2 – LDT 8 foram determinadas, anteriormente, através do ensaio de *binding* utilizando o radioligante agonista [3H]-8-OH-DPAT (Nascimento, 2011).

## 5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem do conteúdo de proteínas nas amostras foi realizada pelo método colorimétrico proposto por LOWRY e cols., (1951) modificado para microplaca (placa de 96 poços). Para a construção da curva padrão utilizou-se a proteína albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 50, 100, 200, 250, 350 µg/mL.

Adicionou-se 50 µL dos padrões de proteína, 50 µL de amostras diluídas de proteína em estudo, ou 50 µL de água (branco) a cada poço contendo 250 µL de uma solução de carbonato dissódico 2% em NaOH 0,1N, sulfato cúprico 1% e tartarato de sódio-potássio 2%. Por fim, seguiu-se a adição de 15 µL do reagente de Folin a cada poço e homogeneização com pipeta multicanal. A placa foi incubada por 45 minutos a temperatura ambiente a partir da homogeneização do primeiro poço. Os valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro de placa em comprimento de onda igual a 700 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e usando dois fatores de diluição diferentes. Os cálculos do conteúdo de proteínas das amostras foram realizados por interpolação utilizando os valores de absorbância da curva padrão *versus* concentração de proteína, os quais foram analisados por regressão linear com o uso do programa GraphPad Prism 4.0. Os valores foram expressos em mg proteína/mL de homogeneizado.

## III. G. MEDIDAS DE MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR ( $[Ca^{2+}]_i$ )

As afinidades dos LDTs pelos subtipos AR- $\alpha_1$  humanos foram determinadas medindo o aumento da concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em fibroblastos, células Rat-1, que expressam estavelmente AR- $\alpha_{1A}$ , AR- $\alpha_{1B}$  ou AR- $\alpha_{1D}$  (VÁZQUEZ-PRADO e cols.,1997). Estas células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 300 µg/mL de sulfato de neomicina G418 análogo, 1% de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10.000 µg/mL) e 0,25 µg/mL anfotericina B, (Invitrogen, EUA) e mantidas em incubadora (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>) até confluência.

As células foram carregadas com 2,5  $\mu\text{M}$  fura-2/AM por 60 minutos a 37°C, em HEPES (20 mM), tampão para ensaio de medida de cálcio intracelular (ver sessão **III.C.3**).

Em seguida, as células foram dissociadas por tripsinização 0,25%, lavadas para remover o fluoróforo não incorporado, e incubadas ( $10^6$  células / condição) com os LDTs ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M), BMY7378 ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M), tansulosina ( $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  M) ou PBS (veículo utilizado na solubilização das substâncias) por 100 segundos, antes da estimulação com 100  $\mu\text{M}$  de fenilefrina.

A excitação do fluoróforo foi realizada a 340 e 380 nm e a emissão foi medida a 510 nm, em intervalos de 0,5 seg, usando um espectrômetro de luminescência Aminco Bowman Série 2 (Rochester, NY, EUA). Os valores de pico de fluorescência foram utilizados para a análise de dados, e a concentração de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foi calculada tal como descrito anteriormente (GRYNKIEWICZ e cols., 1985).

### **III. H. ENSAIOS *IN VIVO***

#### **III.H.1. EFEITOS DOS LDTs SOBRE COMPORTAMENTO E TEMPERATURA CORPORAL**

LDT 3, LDT 5 e LDT 8 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), diluídos em solução salina isotônica, foram administrados (volume de administração 100  $\mu\text{L}$ ) por via intraperitoneal em camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g). Ao grupo controle administrou-se somente o veículo. A temperatura foi aferida (sonda retal), sempre no turno da manhã (entre 9 e 11 horas), antes e após 30 e 60 minutos da administração.

Os animais foram previamente treinados permanecendo na sala de experimentação por 2 horas, 24 e 48 horas antes do dia do experimento. No dia do experimento, os animais foram levados à sala de experimentação onde se habituaram por 1h. A sala de experimentação era isolada de ruídos e apenas o experimentador permaneceu na sala ao longo dos treinamentos e experimento.

Após a administração, os animais foram observados em caixas de acrílico, em grupos de 3 animais por vez. A análise comportamental foi avaliada sempre em comparação ao grupo controle, através de cruzes “+” quando os animais apresentavam comportamento mais pronunciado que o grupo controle

ou traços “-” quando apresentavam comportamento menos pronunciado que o grupo controle, de acordo com método anteriormente descrito (LORKE, 1983, modificado; SOUZA e cols.,2011).

A análise comportamental foi realizada durante toda a primeira hora e 2, 4 e 8 horas após a administração. Nos 14 dias a seguir os animais foram avaliados diariamente, sempre pelo turno da manhã (Fig. 18).

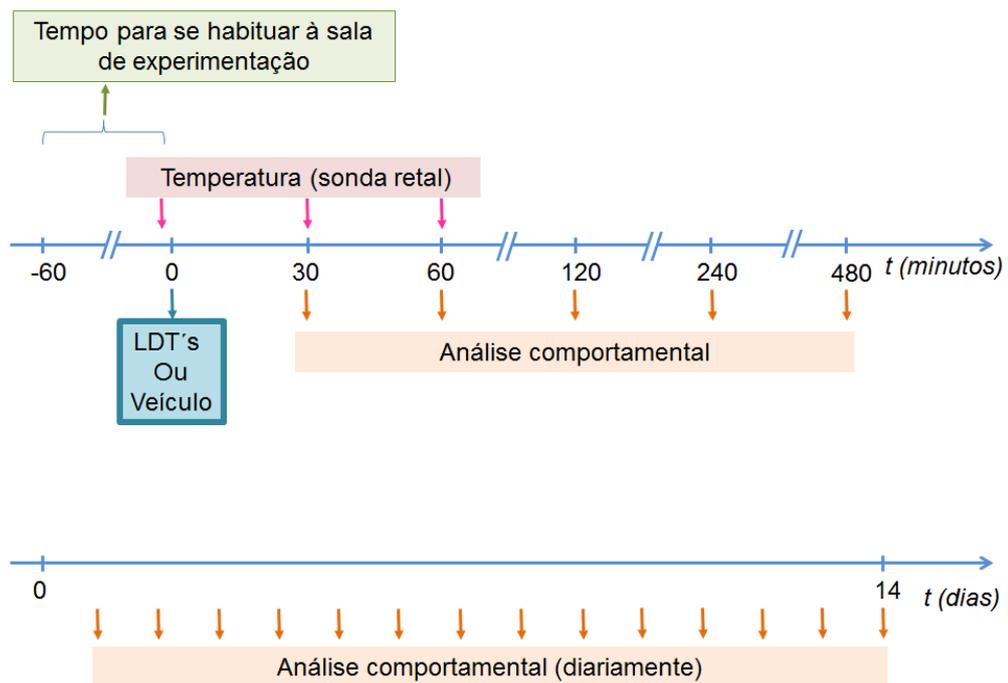


Figura 18: Esquema do protocolo para análise dos efeitos dos LDTs sobre comportamento e temperatura corporal.

Os parâmetros avaliados seguem sumarizados na tabela a seguir.

Tabela 3: Parâmetros fisiológicos avaliados *in vivo*

Parâmetro	Itens avaliados
Bem estar	Aparência geral e irritabilidade
Coordenação motora	Caminhada, atividade geral, resposta ao toque, resposta a constrição de cauda, contração abdominal
Tônus muscular	Capacidade de segurar o próprio peso ao se segurar em barra
Estado de atenção	Atividade exploratória, reflexo, estado cataléptico (resposta exploratória frente a barra)
Atividade sobre SNC	Sedação, hipnose e anestesia, tremores, convulsão, hiperatividade
Atividade sobre SNA	Lacrimejamento, pilo-ereção, hipotermia, frequência respiratória, micção, defecação

### III.H.2. PRESSÃO INTRA-URETRAL (PIU)

Uma grande dificuldade durante o estudo de novos fármacos para o tratamento da HPB é a ausência de um modelo animal que reproduza as características hiperplásicas e de LUTS observadas na HPB. Isso se deve a diferenças anatômicas entre a próstata humana e de animais de experimentação (MARKER e cols., 2003, PRADIDARCHEEP e cols., 2011, GANDELLINI e cols., 2012).

Porém, os ensaios de medida de pressão intrauretral (PIU) são utilizados para estimar a potência de novos fármacos *in vivo* (HIEBLE, 2011). AKIYAMA e colaboradores (1999) propuseram a avaliação do aumento do tônus muscular liso prostático (e da uretra) por meio da ativação de AR- $\alpha_1$ . A próstata corresponde a um tecido enriquecido em AR- $\alpha_{1A}$  funcionais tanto em humanos quanto em ratos (WALDEN e cols., 1999, SCOFIELD e cols., 1995). Nesse sentido, verifica-se o papel de um antagonista AR- $\alpha_{1A}$  utilizando este modelo.

Para realização desses ensaios, ratos Wistar machos (250-350 g) foram anestesiados por via peritoneal com pentobarbital sódico (60 mg/kg). Após indução da anestesia, os animais foram traqueostomizados, a veia jugular

direita foi canulada utilizando cânula de polietileno preenchida com solução salina heparinizada (50 U/mL) para administração das substâncias teste.

A bexiga, a próstata e a uretra foram expostas através de uma incisão na linha média da parede abdominal. Através do ápice da bexiga, foi inserido um cateter, preenchido com solução salina heparinizada (50 U/mL), até a uretra prostática. O cateter foi fixado através de duas suturas com linha de algodão, uma acima da próstata, na saída da bexiga, e a outra abaixo da próstata. Uma terceira sutura, no ápice da bexiga, se fez necessária para melhor estabilidade do sistema. Tal cateter fazia conexão com o transdutor de pressão (ADInstruments, Austrália), este preenchido com água para medir a pressão intra-uretral em função do deslocamento da coluna de água. A uretra prostática foi então submetida a uma pré-carga, de ~10 cm H<sub>2</sub>O pela injeção de 0,2 mL de salina através do cateter, por 30 minutos (período de estabilização) (Fig. 19).

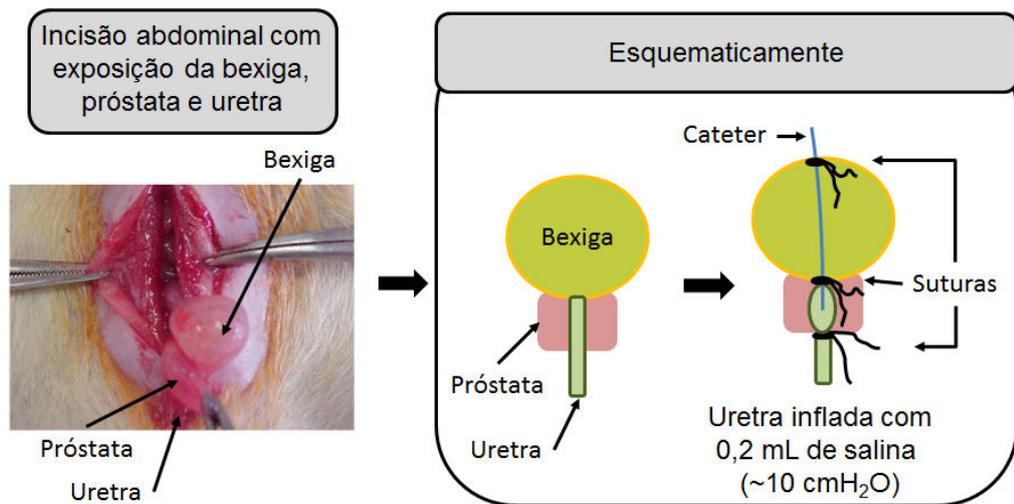


Figura 19: Representação esquemática do acoplamento do transdutor de pressão ao interior da uretra prostática de ratos Wistar machos para realização dos ensaios de pressão intra-uretral.

Após a estabilização, realizou-se uma curva dose-resposta à FE (1–100 µg/kg, i.v. em bolus), num intervalo de 10 minutos entre cada administração. Em seguida mediu-se o aumento da PIU induzida por dose sub-maxima de FE (30 µg/kg), em bolus, na ausência e presença do pré-tratamento por 10 minutos com LDTs ou tansulosina (0,1 e 0,01 µg/kg i.v. em bolus, respectivamente) (Fig. 20). Todas as soluções administradas foram diluídas com salina isotônica.

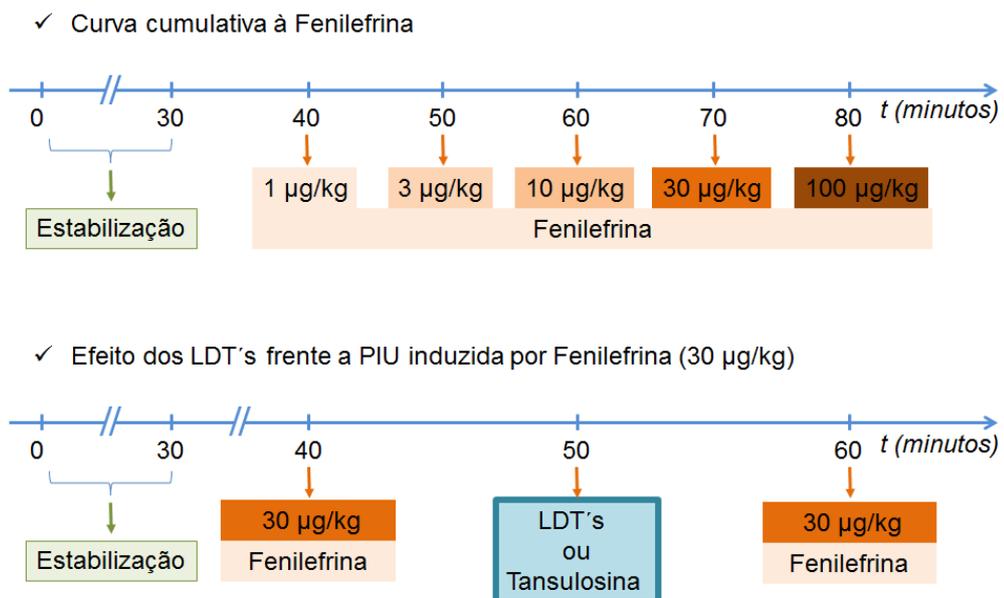


Figura 20: Esquema dos ensaios de medida de pressão intra-uretral (PIU).

Os dados foram expressos como percentual do aumento da pressão intra-uretral inicial. A curva média foi ajustada por regressão não linear usando a equação (Prism) "log (agonista) versus resposta".

Com a eleição da substância mais promissora, seguimos com a realização de experimentos para a construção de curva dose-resposta para o LDT 5 (0.01 – 3 µg/kg, i.v. em bolus) e Tansulosina (0.001 – 1 µg/kg, i.v. em bolus). Cada animal foi utilizado apenas uma vez para a análise de uma dose (Fig. 21).

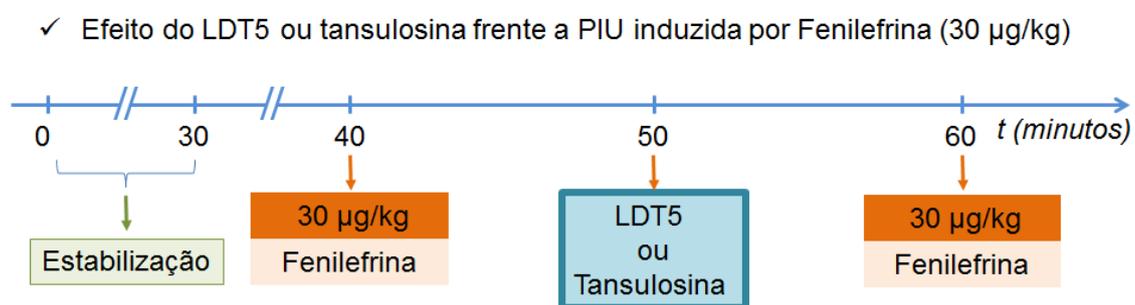


Figura 21: Esquema dos ensaios de medida de pressão intra-uretral (PIU) – Curva dose-resposta para o LDT5 e tansulosina.

### III.H.3. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

Ratos Wistar machos (250-350 g) foram anestesiados por via peritoneal com pentobarbital sódico (60 mg/kg). Após indução da anestesia, os animais foram traqueostomizados, a veia jugular direita e a artéria carótida foram canuladas utilizando-se cânulas de polietileno preenchidas com solução salina heparinizada (50 U/mL) para administração das substâncias teste ou para a conexão com o transdutor de pressão (ADInstruments, Austrália), respectivamente.

Após 30 minutos, período de estabilização do animal após a cirurgia, administrou-se, por via intravenosa, o LDT 3, LDT 5 (0,1 µg/kg, i.v. em bolus) ou tansulosina (0,01 µg/kg, i.v. em bolus) diluídos em 100 µL de solução salina isotônica. Ao grupo controle administrou-se somente o veículo. As

administrações foram feitas em bolus, e a pressão arterial média (mm Hg) foi monitorada continuamente ao longo de 10 minutos (Fig. 22).

Os dados foram expressos como percentual de redução da pressão arterial inicial.

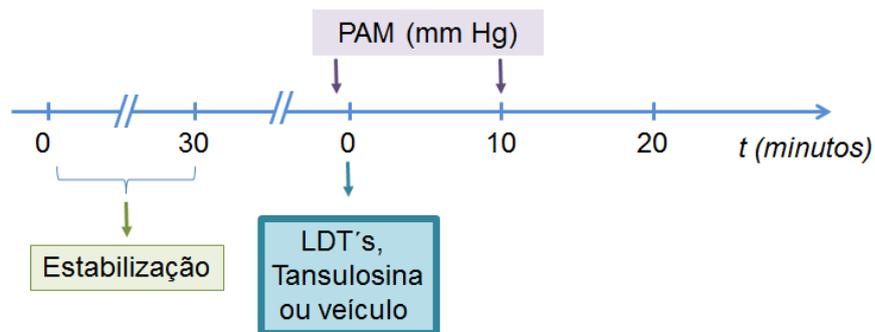


Figura 22: Esquema dos ensaios de medição da pressão arterial média (PAM).

Com a eleição da substância mais promissora, seguimos com a realização de experimentos para a construção de curva dose-resposta para o LDT 5 (0.1 – 100 µg/kg, i.v. em bolus) e Tansulosina (0.01 – 30 µg/kg, i.v. em bolus). Cada animal foi utilizado apenas uma vez para a análise de uma dose.

### III.I. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS)

#### III.I.1. CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS

Células de câncer de próstata androgênio independente (DU-145), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ) (74<sup>a</sup> e 75<sup>a</sup> passagens) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO®) suplementado com 10% de SFB, 1% de piruvato e 1% de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10.000 µg/mL) (Invitrogen, EUA) e mantidas em incubadora (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>) até confluência.

Utilizamos também células estromais isoladas de amostras de pacientes (três pacientes diferentes; alíquotas individuais para cada paciente) portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) submetidos à ressecção transuretral no Serviço de Urologia do Hospital do Andaraí (RJ) (SOUZA e cols., 2011; protocolo nº CAAE-0029.0.197.000-05), gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Eurico Nasciutti (ICB, UFRJ). As células HPB (9<sup>a</sup> -11<sup>a</sup> passagens), foram

cultivadas em meio de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de piruvato de sódio e 1% de penicilina/estreptomicina, mantidas em incubadora (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>) até confluência.

Ambas as células, ao atingirem confluência, foram subcultivadas sendo dissociadas por solução de tripsina 0,25% (Invitrogen, EUA) em solução salina tamponada (PBS: NaCl 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM e KCl 5 mM) por 3-5 minutos. A dissociação foi parada pela adição de meio de cultivo contendo 10% de SFB.

### **III.1.2. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO***

Os dois tipos celulares foram submetidos a tratamento com os LDTs na ausência ou presença do estímulo proliferativo. A proliferação celular foi induzida por via adrenérgica, pela adição de fenilefrina (FE) (agonista AR- $\alpha_1$ ) (KOJIMA e cols., 2009), ou por via serotoninérgica, pela adição de serotonina (5-HT) (ABDUL e cols., 1994, DIZEYI e cols., 2011).

Inicialmente avaliou-se a cinética de crescimento dos dois tipos celulares, afim de determinar a quantidade de células a serem plaqueadas para que se atingisse a semi-confluência em 72h, tempo total para realização de ambos ensaios (MTT e viabilidade por exclusão por azul de Trypan).

Após plaqueamento ( $5 \times 10^3$  ou  $3 \times 10^3$  células/poço (DU145 e HPB, respectivamente)), em placas de 96 poços para ensaios de MTT ou  $2,5 \times 10^4$  ou  $10^4$  células/poço (DU145 e HPB, respectivamente), em placas de 24 poços para ensaios de viabilidade por exclusão por azul de Trypan, as células foram inicialmente cultivadas em meio isento de SFB por 24 horas. Em seguida as células foram mantidas com meio suplementado com 2,5% ou 10% (DU145 e HPB, respectivamente) de SFB e tratadas com 5-HT (1 ou 3  $\mu$ M, DU145 e HPB, respectivamente) ou fenilefrina (3  $\mu$ M) na ausência ou presença dos LDTs (50 nM), BMY7378 (50 nM) (antagonista AR- $\alpha_{1D}$  seletivo), *p*-MPPF (50 nM) (antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>) ou PBS (veículo de diluição das substâncias).

As células de HPB foram submetidas a um protocolo adicional para avaliar o possível transativação dos receptores de fator de crescimento

epidermal (EGFR) por ativação dos AR- $\alpha_{1D}$ . Neste protocolo, as células tiveram como estímulo proliferativo a adição de fenilefrina (3  $\mu$ M), ou fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês “*Epidermal growth fator*”) 0,1  $\mu$ M, utilizado como um controle positivo da ativação dos EGFR, na ausência ou na presença de um pré-tratamento com LDTs ou BMY7378 (antagonista dos adrenoceptores  $\alpha_{1D}$ ; controle positivo) (50 nM), AG1478 5  $\mu$ M (antagonista de EGFR), GM6001 10  $\mu$ M (inibidor de metaloproteinase), PD98059 1  $\mu$ M (inibidor de MEK) ou CRM197 200 ng/mL (inibidor específico da HB-EGF).

Os antagonistas foram sempre adicionados 30 minutos antes da adição do agonista (fenilefrina). Após 24 horas o meio foi trocado e os tratamentos foram repetidos. Ao completar 48 horas do início do tratamento, a proliferação celular foi analisada pelo uso da técnica de MTT (MOSMANN, 1983) e a viabilidade celular aferida pela técnica de exclusão com azul de Trypan (KALTENBACH e cols., 1958) (Fig. 23 e 24).

### 1. MTT (BROMETO DE 3-(4,5-DIMETILIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO)

Em placas de 96 poços, após 48h do início dos tratamentos (Fig. 23), o meio de cultura foi substituído por 100  $\mu$ L de meio fresco seguido pela adição de 10  $\mu$ L de MTT 12 mM (em PBS estéril).

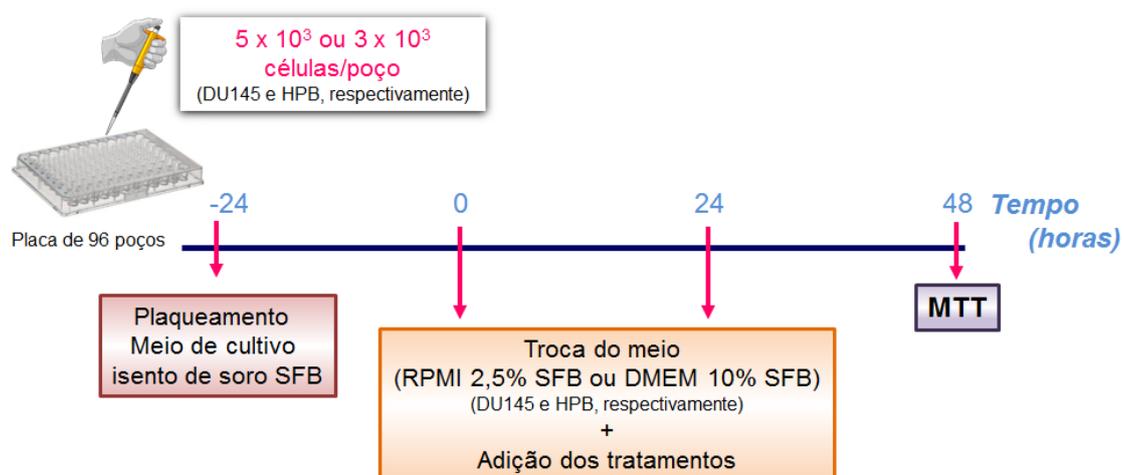


Figura. 23: Esquema de cultivo e tratamento das células DU-145 e HPB para ensaio de proliferação celular (MTT).

As células foram incubadas a 37°C por 4 horas antes da adição de 100 µL de SDS 0,1 g/mL (em HCl 0,01 M) e uma nova etapa de incubação a 37°C por mais 4 horas. Cada poço foi homogeneizado e a absorbância determinada em espectrofotômetro de placa (570 nm).

## 2. VIABILIDADE CELULAR – EXCLUSÃO COM AZUL DE TRYPAN

Em placas de 24 poços, após 48h do início dos tratamentos (Fig. 24), as células foram lavadas com PBS gelado, e em seguida foram tripsinizadas e centrifugadas (300 x g), e, por fim, resuspensas em PBS.

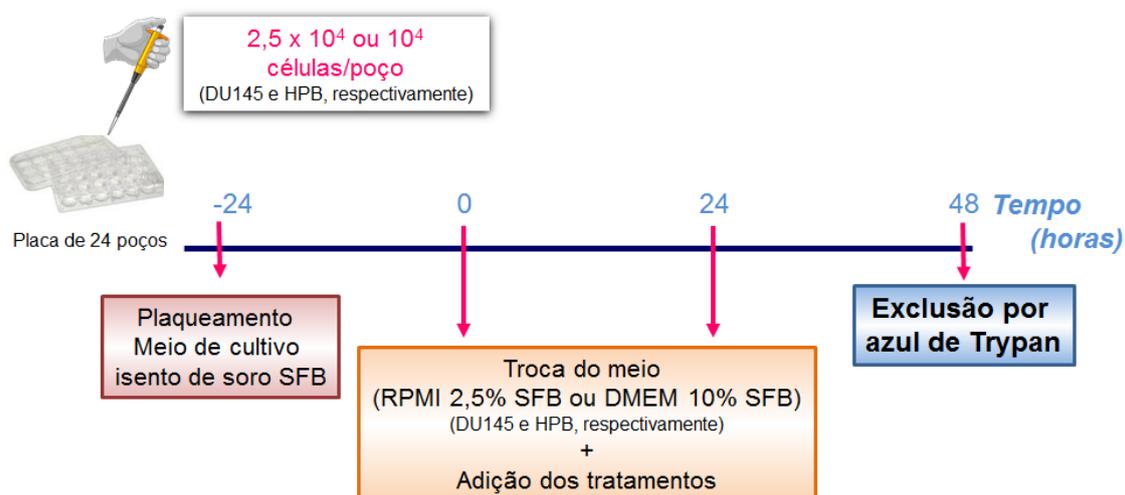


Figura 24: Esquema de cultivo e tratamento das células DU-145 e HPB para ensaio de viabilidade por exclusão com azul de Trypan.

Recolheu-se alíquotas de 10 µL da suspensão celular às quais adicionou-se 10 µL de azul de Trypan (0,4% em PBS). As células foram consideradas viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, não se apresentaram coradas com o azul de Trypan. Contou-se as células viáveis em relação à quantidade de células presentes nos quatro campos mais externos da câmara de Neubauer.

### 3. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA

As alterações na morfologia celular causadas pelos tratamentos com os LDTs foram avaliadas através do uso da toxina fúngica Faloidina acoplada ao fluorocromo Cy3. Esta toxina produzida pelo fungo *Amanita phalloides* (chapéu da morte), ao ligar-se aos filamentos de actina F do citoesqueleto, os estabiliza e, portanto, permite analisar a morfologia celular. Simultaneamente, analisamos a atividade proliferativa das células tratadas e controle através da imunomarcação para o antígeno ki67. O antígeno ki67 é uma proteína nuclear, expressa nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular e ausente na fase G0 e, em células quiescentes. Este antígeno não é detectável durante processos de reparo de DNA e possui meia-vida curta (sendo degradado em aproximadamente uma hora após a mitose). Assim, a presença do antígeno Ki67, mesmo como marcações tênues, é estritamente associada a progressão do ciclo celular.

Para este ensaio,  $7,5 \times 10^4$  células estromais de HPB foram plaqueadas por poço sobre lamínulas, em placas de 24 poços, em meio isento de SFB por 24 horas. Em seguida, as células foram mantidas com meio suplementado com 10% de SFB e tratadas com fenilefrina (3  $\mu$ M) na ausência ou presença dos LDTs (50 nM), BMY7378 (50 nM) (antagonista AR- $\alpha_{1D}$  seletivo), tansulosina (5nM) (antagonista AR- $\alpha_{1A}$ seletivo), ou PBS (veículo de diluição das substâncias). Os antagonistas foram sempre adicionados 30 minutos antes da adição do agonista (fenilefrina). Após 24 horas, o meio foi trocado e os tratamentos repetidos. Ao completar 48 horas do início do tratamento, o sobrenadante foi completamente removido, as células foram lavadas em PBS e fixadas em 4% de PFA durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas por três vezes com PBS e incubadas com 50 nM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em PBS por 30 minutos e, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 (Sigma). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS/BSA 5% e as ligações inespecíficas do anticorpo secundário com PBS/Normal Goat Serum 10%. Realizados os bloqueios, o anticorpo primário monoclonal anti-antígeno ki67 (Dako, 1/100) foi incubado "overnight" à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas por mais 2 horas com o anticorpo secundário Alexa

488 de cabra (Invitrogen, 1/300). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas por mais 1 hora com a faloidina (Sigma, 1/100). Após serem novamente lavadas, os núcleos celulares foram marcados por cinco minutos com DAPI (4',6'-diamidino-2phenylindole dihydrochloride, Santa Cruz Biotechnology). Ao final, as células foram lavadas e as lamínulas montadas sobre lâminas histológicas com N-propilgalato (Sigma), antes de serem analisadas e fotografadas por meio de microscopia confocal (LSM510 Meta Zeiss Laser Scanning confocal microscope). Para cada caso, o controle negativo foi constituído de células que passaram por todo o processo, mas com a omissão dos anticorpos primários.

### **III. J. ENSAIOS DE WESTERN BLOT**

#### **III. J.1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS LDTs SOBRE A VIA DAS MAP-KINASES**

Células estromais provenientes de pacientes portadores de (HPB) e mantidas em cultura até confluência (placa 6 poços) (descritas em III.I.1.), foram incubadas por 15 minutos na ausência de qualquer agente (basal) ou na presença de fenilefrina 100  $\mu$ M (agonista do AR- $\alpha_1$ ) na ausência ou na presença de um pré-tratamento por 10 minutos com LDTs (1  $\mu$ M). Em seguida, as células foram lavadas com solução PBS gelada e lisadas com tampão RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM e 1% de Nonidet P40, em gelo), centrifugadas a 13.000g durante 15 minutos. As proteínas presentes no sobrenadante foram separadas por eletroforese em 10% SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas por 1 hora com leite desnatado 5% (OLIVARES-REYES e cols., 2005). Em seguida, as membranas foram incubadas (12 hora, 4° C) com anticorpos primários anti-ERK, nas suas formas totais e fosforiladas (i.e., ativadas) (Cell Signaling). Em seguida, foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, e a reação revelada por quimioluminescência (ECL). A análise densitométrica foi realizada com o programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

### III. L. ANÁLISE DOS DADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos nos ensaios de ligação foram analisados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 5.01 (EUA), a fim de se calcular os parâmetros da curva de competição ( $CI_{50}$ ) e da curva de saturação ( $K_d$  e  $B_{max}$ ).

Em especial, para os experimentos de saturação nos receptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos foram testados os modelos de um ou dois sítios de ligação, escolhendo-se o que melhor se aplicava, baseando-se no teste F (De LEAN e cols., 1982). Assim, quando a soma dos quadrados dos erros foi reduzida significativamente ao assumir o modelo de dois sítios frente ao modelo de um sítio, o primeiro modelo foi utilizado para se obter estimativas dos valores de  $K_d$  da prazosina. Por outro lado, quando não houve melhora significativa ao adicionar um segundo sítio, foi obtido um único valor de  $K_d$ .

A diferença entre os grupos experimentais foi analisada por análise de variância com fator único (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls (mais de 2 grupos), em ambos os casos considerando um valor de  $P < 0,05$  como sendo significativo.

*Resultados*

---

## IV. A. AVALIAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES MOLECULARES DOS LDTs

## IV. A.1. “REGRA DOS CINCO” DE LIPINSKI (RO5)

Os dados da avaliação RO5 de todos os derivados *N*-fenilpiperazícos avaliados nesta tese podem ser observados na Tabela 4. As propriedades moleculares dos LDT3, LDT5 e LDT8 foram calculadas e analisadas segundo a RO5 (LIPINSKI e cols., 1997). Todos os LDTs tiveram boa adesão a RO5, e nenhuma regra foi violada, o que sugere que eles teriam potencialmente biodisponibilidade por via oral.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos derivados *N*-fenilpiperazínicos

Propriedades físico-químicas <sup>a</sup>	LDT3	LDT5	LDT8	RO5 <sup>b</sup>
Aceptores de ligação hidrogênio	4	5	5	≤ 10
Doadores de ligação hidrogênio	0	0	0	≤ 5
Massa Molecular	326,43	356,46	354,44	≤ 500
cLogP	3,68	3,5	4,16	≤ 5
Número de regras violadas	0	0	0	≤ 1

<sup>a</sup> Propriedades moleculares calculadas, para a molécula na sua forma não ionizada, pelo programa Advanced Chemistry Development, inc. software acd/Percepta versão 14.0.0 (Build 2254), módulo PhysChem.

<sup>b</sup> LIPINSKI e cols., 1997.

## IV. A. 2. EFICIÊNCIA DO LIGANTE (EL)

Para uma molécula ser atrativa para ser desenvolvida a um fármaco o valor de EL deve estar entre 0,2 e 0,6 (HOPKINS e cols., 2014). Nota-se que LDT3, LDT5 e LDT8 apresentam valores dentro deste intervalo de valores (Tabela 5).

Tabela 5: Combinação das Propriedades físico-químicas e farmacológicas (EL) dos derivados *N*-fenilpiperazínicos

Receptor	Eficiência do Ligante (EL)		
	LDT3	LDT5	LDT8
<b>AR-<math>\alpha_{1A}</math></b> <sup>a</sup>	0,49	0,45	0,45
5-HT <sub>1A</sub> <sup>b</sup>	0,52	0,46	0,60

<sup>a, b</sup> EL calculada a partir dos valores médios de *K<sub>i</sub>* obtidos através de ensaios de *binding* utilizando preparações de fígado de coelho e hipocampo de rato, respectivamente (<sup>a</sup> Nascimento, 2011).

#### IV. B. ENSAIOS FUNCIONAIS - CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA – TIRAS DE PRÓSTATA

A próstata de rato é um tecido que expressa majoritariamente receptores AR- $\alpha_{1A}$  os quais estão envolvidos na contração (MARSHALL e cols., 1995; NASU e cols., 1996; HIRAOKA e cols., 1999). Tendo isto em vista, os ensaios funcionais de contração em modelo de órgão isolado foram realizados utilizando tiras (10 mm) da porção ventral deste tecido.

Quando adicionados ao banho de incubação, nenhum dos LDTs a 10 nM alterou a linha de base. Desta forma, nesta concentração, descartou-se um possível efeito agonista sobre receptores que alterem o tônus prostático.

Foram construídas curvas cumulativas de FE, antes e após a incubação por 1 hora com os LDTs (10 nM) ou com tansulosina (10 nM) (antagonista seletivo dos  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptores).

Paralelamente, visando descartar a existência de algum artefato sobre a contração medida, um controle temporal foi realizado onde adicionou-se apenas o veículo (água ultrapura) no lugar da substância a ser testada, seguindo rigorosamente o mesmo protocolo usado para as demais cubas, onde

foram adicionados os LDTs. Nenhuma alteração de resposta foi observada, descartando qualquer efeito temporal nesses ensaios.

A curva concentração-resposta à fenilefrina apresentou valores médios de  $EC_{50}$  (coluna “Controle” na tabela 6) de 0,42  $\mu$ M, valor reportado na literatura (THIYAGARAJAN e cols., 2002).

Todos os LDTs induziram um deslocamento das curvas concentração-resposta à fenilefrina para direita, comportamento típico de antagonismo competitivo superável (Fig. 25). Assim, os dados sugerem um efeito antagonista sobre os  $AR-\alpha_{1A}$  para todas as substâncias estudadas. Uma vez construídas as curvas concentração-resposta à fenilefrina, calculou-se a afinidade aparente dos antagonistas ( $K_B$ ) *in vitro* utilizando a equação de Gaddum.

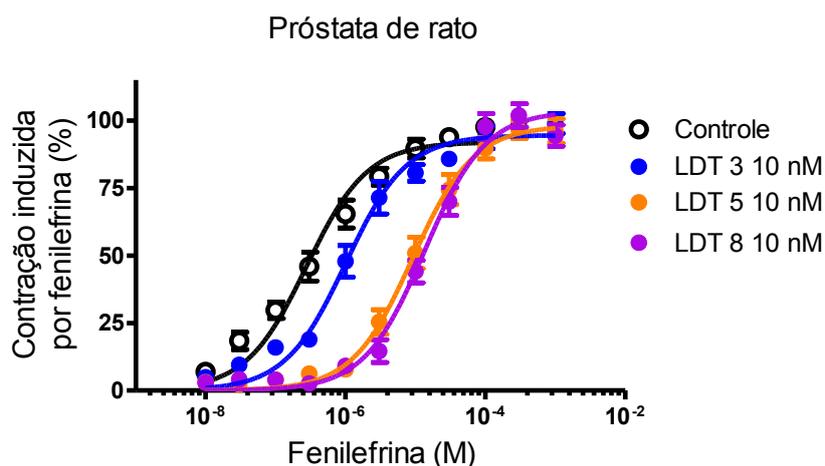


Figura 25. Efeito da pré-incubação (1h) dos LDTs sobre a contração induzida pela fenilefrina em próstata de rato. Os dados estão expressos como médias  $\pm$  EPM de 6-9 experimentos utilizando amostras de tecidos a partir de diferentes animais.

Tabela 6. Afinidade dos LDTs por adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  nativos de próstata de rato.

Receptor	Substância (n)	Controle	Tratado	$\log K_B \pm EPM$ (M)	$K_B$ (nM)
		$CE_{50}$ ( $\mu M$ ) [-log $CE_{50} \pm EPM$ ]	$CE_{50}$ ( $\mu M$ ) [-log $CE_{50}$ (M) $\pm EPM$ ]		
$\alpha_{1A}$	LDT3 (7)	0,24 [6,62 $\pm$ 0,07]	1,19 [5,92 $\pm$ 0,08]	- 8,58 $\pm$ 0,11***	<b>2,62</b>
	LDT5 (13)	0,14 [6,85 $\pm$ 0,07]	7,92 [5,10 $\pm$ 0,10]	- 9,74 $\pm$ 0,10	<b>0,18</b>
	LDT8 (10)	0,29 [6,60 $\pm$ 0,07]	17,6 [4,83 $\pm$ 0,08]	- 9,76 $\pm$ 0,10	<b>0,17</b>
	Tansulosina (3) <sup>a</sup>	1,23 [5,91 $\pm$ 0,04]	149 [3,83 $\pm$ 0,03]	- 10,08 $\pm$ 0,02	<b>0,08</b>

<sup>a</sup> Dados retirados de CHAGAS-SILVA e cols., 2014.

Os valores de  $CE_{50}$  e  $K_B$  foram estimados individualmente a partir de contração isométrica de tiras de próstata de rato estimuladas com fenilefrina, na ausência e presença de 10 nM do antagonista.

Tansulosina é um antagonista de alta afinidade por adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e foi usada como controle positivo.

\*\*\*  $P < 0,001$  comparado à tansulosina (ANOVA fator único seguido pelo teste de Dunnett).

#### IV. C. ENSAIOS DE LIGAÇÃO (BINDING)

##### 1. RECEPTORES NÃO –ALVO (“OFF-TARGET”):

A avaliação das curvas de competição dos LDTs nos ensaios de *binding* competitivo com AR- $\alpha_{2A}$ , receptores muscarínicos e receptores dopaminérgicos  $D_2$ -“like” revelou que tais substâncias competem com os radioligantes de forma concentração-dependente (Fig. 26).

Para os AR- $\alpha_{2A}$ , LDT3, LDT5 e LDT8 apresentaram valores de  $K_i$  em torno de 1  $\mu M$  (Tabela 7), logo todos os LDTs apresentaram afinidade relativamente baixa em relação aos receptores alvos (faixa nanomolar, vide introdução e Tabela 3). Além disso, os LDTs apresentaram afinidade ainda menor ( $K_i > 30 \mu M$ ) para receptores muscarínicos (Tabela 7).

As afinidades para receptores  $D_2$ -“like” foram mais elevadas, sobretudo no que diz respeito ao LDT8 o qual apresentou valor de  $K_i$  de 6 nM, em torno de 15 vezes menor do que para os LDT3 e LDT5 ( $K_i = 186$  nM e 100 nM, respectivamente) (Tabela 7). Porém, os valores de  $K_i$  para os receptores  $D_2$ -

“like” são maiores do que para o receptor AR- $\alpha_{1A}$  (cerca de 70 e 550 vezes, para LDT3 e LDT5 respectivamente), receptor alvo no contexto desse estudo.

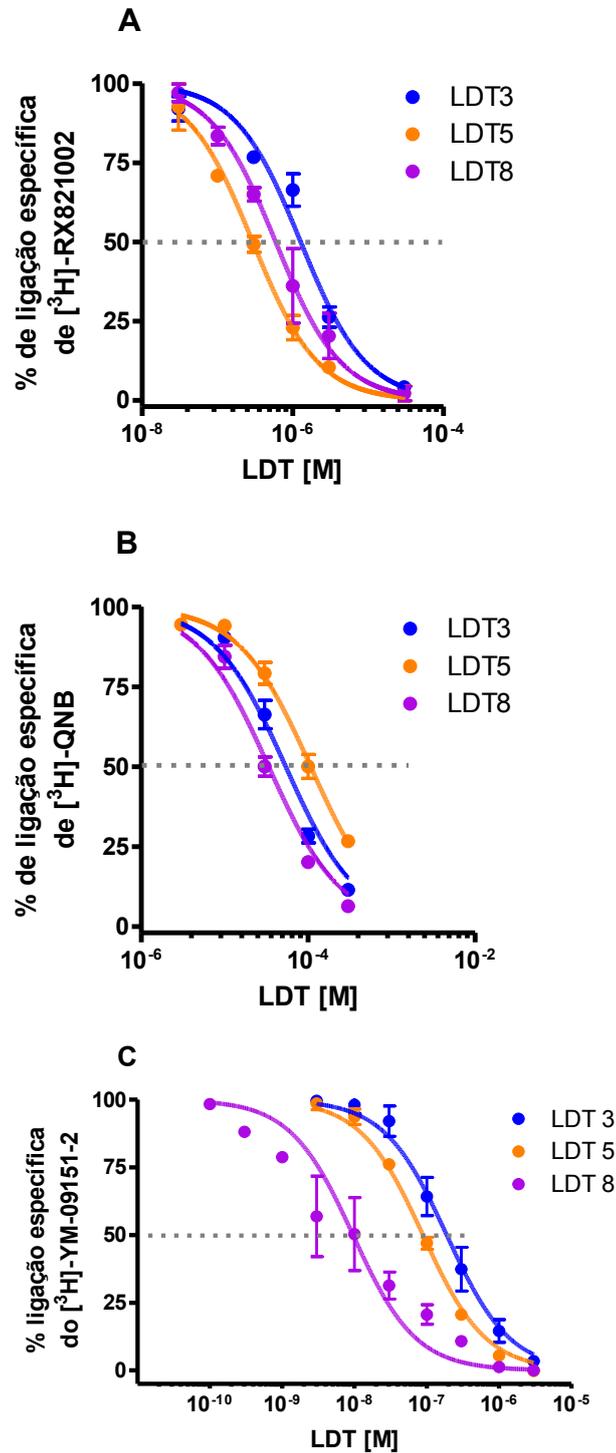


Figura 26. Avaliação da potência dos LDT3, LDT5 e LDT8 em adrenoceptores  $\alpha_{2A}$  (A), receptores muscarínicos (B) e receptores  $D_2$ -like (C). Inibição da ligação específica de  $[^3\text{H}]\text{-RX821002}$  (1 nM, A),  $[^3\text{H}]\text{-QNB}$  (0,1 nM, B) e  $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$  (0,1 nM, C) pelos derivados LDT3, LDT5 e LDT8. As figuras representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 7. Afinidade dos LDTs por receptores não-alvo: AR- $\alpha_{2A}$ , receptores muscarínicos e receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-“like”,

Receptor	Substância	-log CI <sub>50</sub>	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)	n
AR- $\alpha_{2A}$	LDT3	5,89 $\pm$ 0,05	0,93	3
	LDT5	6,53 $\pm$ 0,04	0,24	3
	LDT8	6,22 $\pm$ 0,06	0,55	3
	ioimbina	6,76 $\pm$ 0,05	0,12	2
Muscarínico	LDT3	4,26 $\pm$ 0,05	56,7	3
	LDT5	3,97 $\pm$ 0,03	108	3
	LDT8	4,48 $\pm$ 0,06	33,9	3
	pirenzepina	7,13 $\pm$ 0,05	0,02	2
D <sub>2</sub> -“like”	LDT3	6,73 $\pm$ 0,05 <sup>***</sup>	0,19	3
	LDT5	7,05 $\pm$ 0,02 <sup>***</sup>	0,10	3
	LDT8	8,19 $\pm$ 0,1	0,006	3
	Haloperidol	7,93 $\pm$ 0,08	0,01	2

Os valores de CI<sub>50</sub> foram obtidos da análise de curvas médias e expressos como a média  $\pm$  SEM de experiências individuais (n) ; Os valores de K<sub>i</sub> foram calculados utilizando a equação de Cheng-Prusoff. \*\*\*  $P < 0,001$  comparado ao LDT8 (ANOVA fator único seguido pelo teste de Dunnett).

## 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INTRÍNSECA - RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>

Na dissertação de mestrado (Nascimento, 2011) determinou-se os valores de K<sub>i</sub> através de ensaios de *binding* utilizando o radioligante agonista ([<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT) dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Posteriormente foram realizados ensaios de competição utilizando o radioligante antagonista [<sup>3</sup>H]-*p*-MPPF em presença de GTP 1,0 mM (Fig. 27). De posse dos dados nas duas condições experimentais é possível determinar a atividade intrínseca dos LDTs por esses receptores. Segundo ASSIÉ e colaboradores (1999), é possível determinar a atividade intrínseca de um fármaco atuando em receptor metabotrópico através do cálculo da razão entre os valores de K<sub>i</sub> obtidos em experimentos de competição com radioligante antagonista (na presença de GTP) vs radioligante agonista (na ausência de GTP). Na presença de GTP favorecemos o estado de baixa afinidade (ou desacoplado) do receptor (K<sub>i</sub> low). Por outro lado, o

radioligante agonista possui afinidade maior pelo estado de alta afinidade, com formação de complexo ternário com proteína G ( $K_i$  high). Razões dos valores de  $K_i$  (low/high) próximas à unidade indicam que o competidor é uma substância antagonista; razões maiores ou menores do que 1,0 sugerem perfil de agonista ou agonista inverso, respectivamente, como validado no laboratório (NOËL e cols., 2014).

Para os derivados LDT3 e LDT5 as duas curvas de competição foram sobrepostas (Fig. 25A e 25B) e os valores das razões de  $K_i$  foram próximos da unidade, o que sugere que estes derivados *N*-fenilpiperazínicos são antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, pelo menos no que diz respeito a via canônica de sinalização (dependente de proteína G). Por outro lado, o LDT8 apresentou uma razão de  $K_i$  maior que 1,0, aproximadamente 66, porém inferior ao valor de razão obtido com 5-HT (76,8), o que indica que se trata de um agonista parcial desses receptores (tabela 8). Desta forma, este composto deixou de ser estudado.

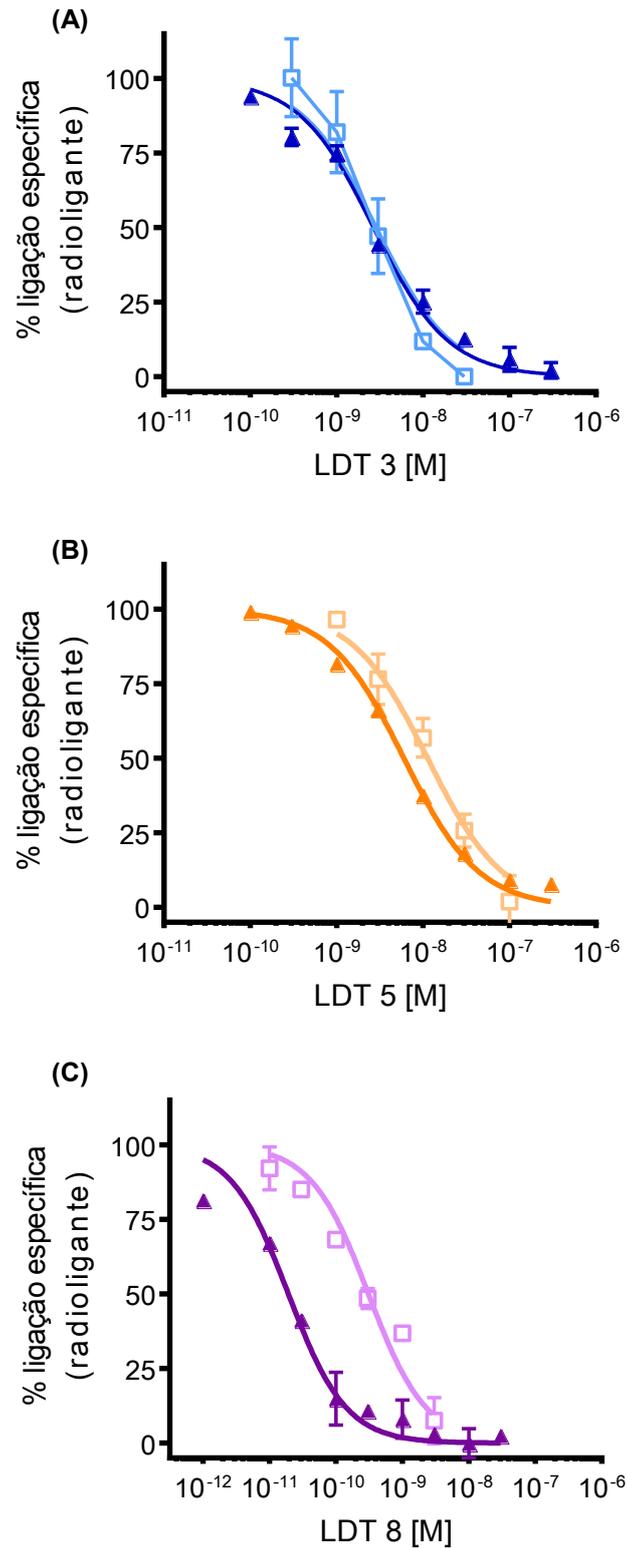


Figura 27: Ligação específica da  $[^3\text{H}]\text{-8-OH-DPAT}$  (1 nM) (símbolos fechados) e  $[^3\text{H}]\text{-MPPF}$  (0,5 nM) (símbolos abertos) em membranas de hipocampo de rato na presença de concentrações crescentes dos derivados (A) LDT3, (B) LDT5 e (C) LDT8. Dados expressos como média  $\pm$  EPM de 2-6 experimentos individuais realizados em triplicata.

Tabela 8: Razão dos valores de  $K_i$  para a determinação da atividade intrínseca dos LDTs nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>

LDT	$K_{i\ Low}$ [nM] (n) pKi ± SEM	$K_{i\ High}$ [nM] (n) pKi ± SEM	$K_{i\ Low}/K_{i\ High}$ [95% I.C.]
3	1,73 (3)	1,12 (4)	1,53
	8,76 ± 0,11	8,95 ± 0,03	[1,02-2,81]
5	6,91 (3)	2,51 (4)	2,75
	8,16 ± 0,09	8,60 ± 0,02	[1,68-4,50]
8	0,62 (3)	0,009 (2)	66,9
	9,21 ± 0,05	11,05 ± 0,026	[46,0-99,8]
5-HT*	213 (6)	3,02 (3)	76,8
	6,67 ± 0,06	8,52 ± 0,02	[40,5-146]

Os valores de intervalo de confiança (I.C.) das razões de  $K_i$  (low/high) foram calculados seguindo o princípio de razões de duas médias com distribuição normal. Foram utilizados os valores de  $pK_i$ , número de experimentos e desvio padrão de cada condição experimental. As análises foram realizadas com auxílio do teste  $t$  de Student (two-tail, GraphPad Prism 5.0), e considerando os parâmetros calculados (diferença entre as médias, erro padrão (EPM), graus de liberdade e valor de  $t$  para  $P < 0,05$ ) (ROBERTSON & LUMLEY, 1989). \* Retirado de CHAGAS-SILVA e cols., 2014

#### IV. D. MEDIDAS DE MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR ( $[Ca^{2+}]_i$ )

Com objetivo de avaliar os efeitos dos LDTs em receptores humanos, utilizou-se fibroblastos Rat-1 transfectados com os AR- $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$  humanos (VAZQUEZ-PRADO e cols., 1997) e a medida de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Pudemos notar que o estímulo das células expressando os AR- $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$  com fenilefrina 100  $\mu$ M promoveu um aumento pronunciado nos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 28 A, B e C, respectivamente).

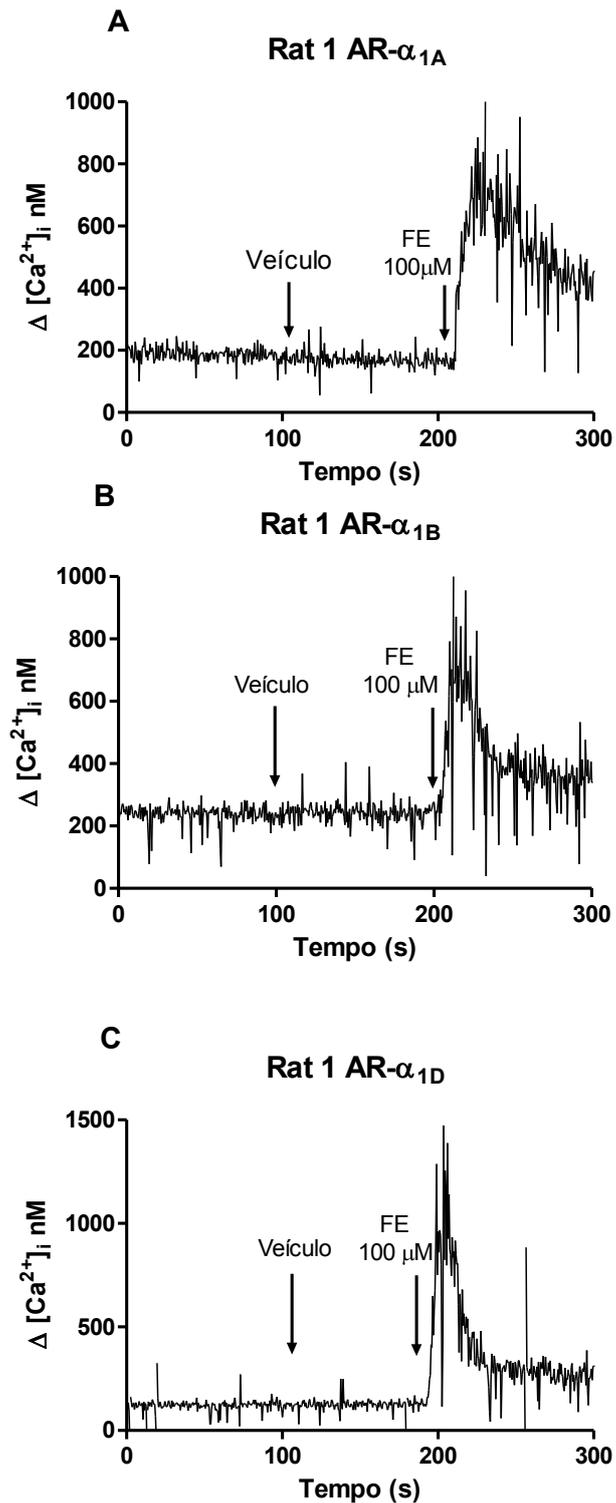


Figura 28. Traçados típicos do ensaio de aumento de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células Rat-1 expressando AR- $\alpha_{1A}$  (A), AR- $\alpha_{1B}$  (B) ou AR- $\alpha_{1D}$  (C). FE=fenilefrina.

Nos três tipos celulares observamos um aumento menos pronunciado de  $[Ca^{2+}]_i$  após o estímulo com fenilefrina 100  $\mu$ M nas células em que houve a pré-

incubação com os LDTs ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M). Resultados semelhantes foram observados após tratamento com os antagonistas tansulosina (AR- $\alpha_{1A}$ ) ( $10^{-10}$  –  $10^{-7}$  M) ou BMY7378 (AR- $\alpha_{1D}$ ) ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M), usados como controles . A figura 29 mostra de maneira representativa essa redução de  $[Ca^{2+}]_i$  em células Rat-1 expressando AR- $\alpha_{1D}$ . LDT3 e LDT5 tiveram menor afinidade por AR- $\alpha_{1B}$  do que para AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  ( $P < 0,05$ ) (Fig. 30 ; Tabela 9).

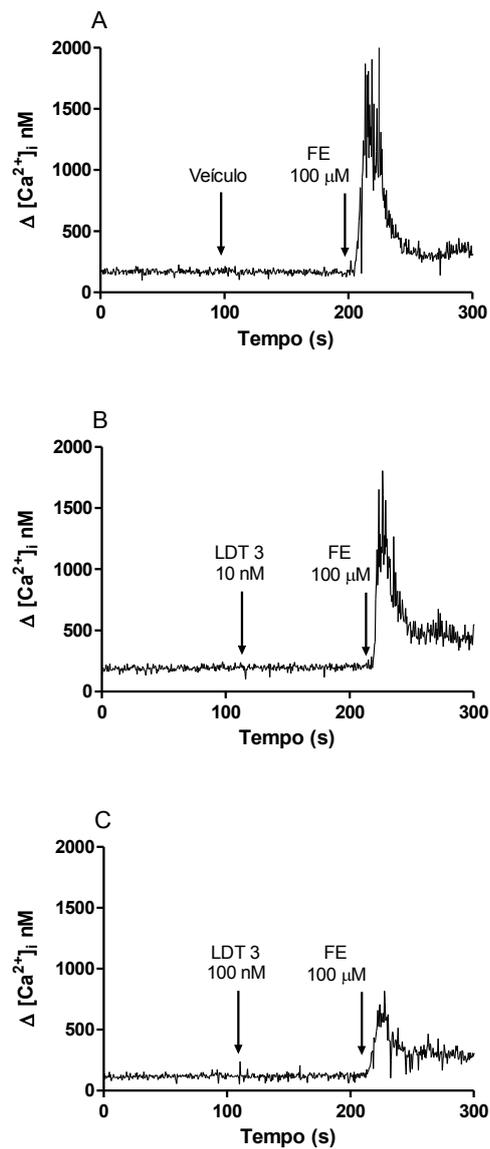


Figura 29: Efeito da pré-incubação do LDT3 sobre a elevação dos níveis de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mediada por fenilefrina (100  $\mu$ M) em fibroblastos Rat-1 transfectados com o receptor humano  $AR-\alpha_{1D}$ . O aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por 100  $\mu$ M de fenilefrina (A; tratados com veículo) foi atenuado por pré-tratamento com 10 e 100 nM LDT3 (B e C, respectivamente).

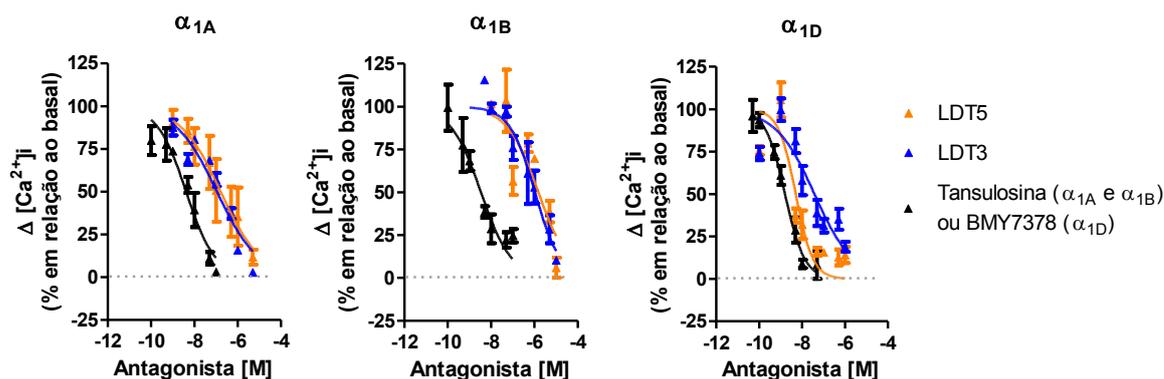


Figura 30: Curva de concentração-resposta para o efeito de fenilefrina frente a pré-incubação do LDT3, LDT5 ou controles (tansulosina para fibroblastos Rat-1 transfectados com o receptor humano AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1B}$ ; ou BMY7378 para fibroblastos Rat-1 transfectados com o receptor humano AR- $\alpha_{1D}$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M.  $n = 3-6$

Tabela 9. Potência dos LDTs por receptores humanos transfectados em células Rat-1, obtidos em ensaios de mobilização de cálcio intracelular

Receptor	Composto	$-\log CI_{50}$	n
AR- $\alpha_{1A}$	LDT3	$7,21 \pm 0,27$ #	3
	LDT5	$7,22 \pm 0,17$ #	3
	Tansulosina	$8,40 \pm 0,19$	3
AR- $\alpha_{1B}$	LDT3	$6,20 \pm 0,23$ *	3
	LDT5	$5,90 \pm 0,28$ *	3
	Tansulosina	$8,80 \pm 0,10$	3
AR- $\alpha_{1D}$	LDT3	$8,74 \pm 0,23$	6
	LDT5	$8,36 \pm 0,18$	6
	BMY7378	$8,58 \pm 0,19$	6

#  $P < 0.05$  comparado à tansulosina em AR- $\alpha_{1A}$  (ANOVA fator único followed by a *post-hoc* Dunnett's test); \*  $P < 0,05$  (teste t Student) comparando aos valores de  $\log CI_{50}$  de cada LDT entre AR- $\alpha_{1B}$  e AR- $\alpha_{1A}$ .

IV. E. ENSAIOS *IN VIVO*

## III.E.1. EFEITOS DOS LDTs SOBRE COMPORTAMENTO E TEMPERATURA CORPORAL

Com o intuito de se obter dados preliminares sobre efeitos potencialmente tóxicos dos dois compostos selecionados, administramos uma dose elevada (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de LDT3 e LDT5 por via intraperitoneal em camundongos. Nestas condições, LDT3 e LDT5 não ocasionaram qualquer letalidade ou mudança de temperatura dos camundongos (Fig. 31). Os resultados estão resumidos na Tabela 10.

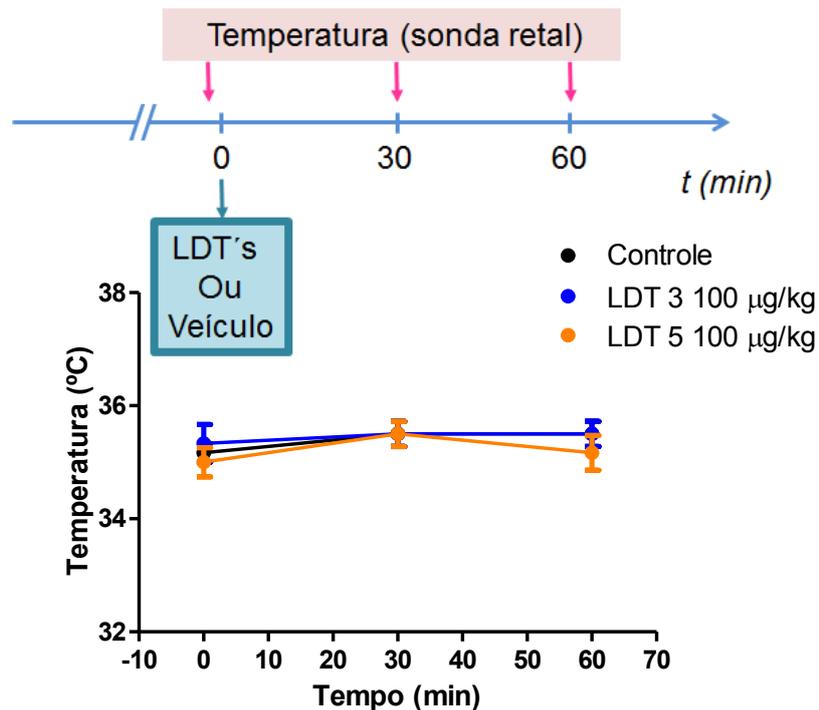


Figura 31: Investigação do efeito dos LDTs sobre a temperatura corporal de camundongos. A temperatura foi medida imediatamente antes ou após 30 e 60 minutos da administração de LDT3 e LDT5 ( $n=6$ ) por via intraperitoneal em dose única (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). O grupo controle recebeu somente o veículo de administração (solução salina). Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA one-way seguido de teste post hoc de Dunnett.

Tabela 10. Efeito dos LDT3 e LDT5 sobre a temperatura corporal de camundongos.

		T (°C)	n
<b>Temperatura basal</b>	<b>Controle</b>	35,17 ± 0,17	6
	<b>LDT3</b>	35,33 ± 0,33	6
	<b>LDT5</b>	35,00 ± 0,26	6
<b>30 minutos após a administração</b>	<b>Controle</b>	35,50 ± 0,22	6
	<b>LDT3</b>	35,50 ± 0,22	6
	<b>LDT5</b>	35,50 ± 0,22	6
<b>60 minutos Após a administração</b>	<b>Controle</b>	35,50 ± 0,23	6
	<b>LDT3</b>	35,50 ± 0,22	6
	<b>LDT5</b>	35,17 ± 0,31	6

Os dados são expressos em média ± S.E.M. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos ( $P > 0,05$ ; ANOVA) .

Além disso, não foram observadas mudanças comportamentais, de acordo com os parâmetros considerados (vide Tabela 1, capítulo III, Materiais e métodos), nem nas horas logo a seguir da administração nem ao longo dos 14 dias de análise.

## IV.E.2. PRESSÃO INTRA-URETRAL (PIU)

A administração intravenosa de fenilefrina promoveu um aumento dose-dependente de PIU em ratos, com um valor de  $DE_{50}$  de 7,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Fig. 32).

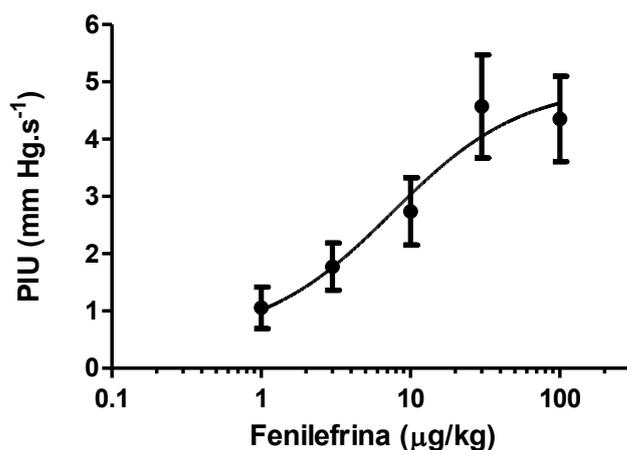


Figura 32: Curva de dose - resposta para o efeito de fenilefrina sobre a pressão intra-uretral (PIU) de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M.  $n = 7-8$

Baseados neste dado, utilizamos a seguir a dose de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (i.v.) de fenilefrina por ser a menor dose em que se obteve o efeito máximo. O tratamento dos animais com LDT3 (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), LDT5 (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou tansulosina (0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) não alterou os valores da linha de base de PIU (Fig. 33). Contudo, o pré-tratamento com LDT3 (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), LDT5 (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e tansulosina (0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) reduziu o efeito pressórico da fenilefrina ( $P < 0,001$ ) (Fig. 33).

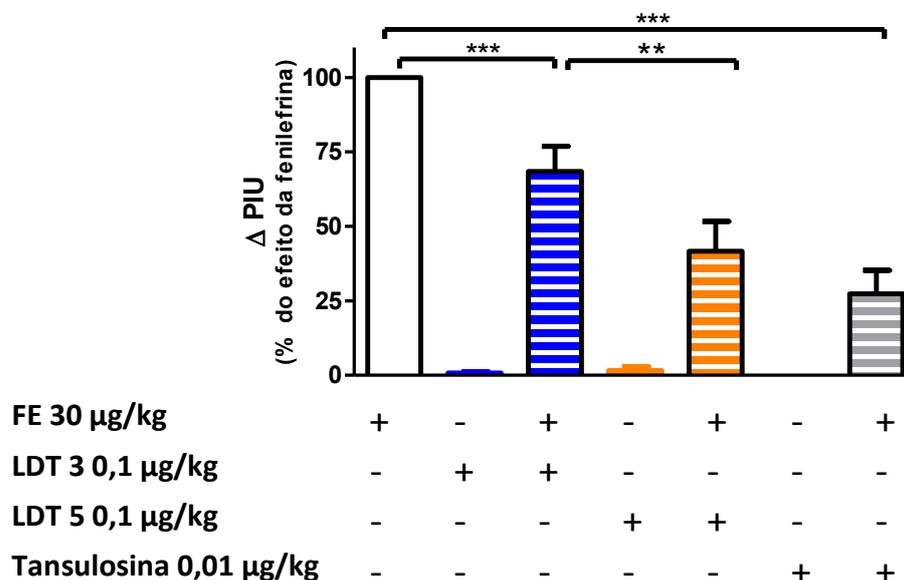


Figura 33: Efeito do pré-tratamento com LDT3, LDT5 ou tansulosina sobre o aumento de pressão intra-uretral (PIU) de rato induzida por fenilefrina (FE). Efeito da FE (30 ug/kg) na ausência (barra branca) ou na presença de pré-tratamento com uma dose única de LDT3 ou LDT5 (0,1 ug/kg, iv) (barras hachuradas azuis e laranjas, respectivamente) ou tansulosina (0,01 ug/kg, iv) (barras cinzas hachuradas). Os dados são expressos como média e S.E.M (n = 3-4). \*\*\* P < 0,001 (tratamentos com LDTs e tansulosina vs. FE), \*\* P < 0,01 (LDT5 vs. LDT3) (ANOVA seguido por teste post-hoc de Dunnett).

Baseado nestes resultados, escolhemos o LDT5 para realizar uma caracterização da curva dose-resposta. Conforme descrito na figura 34, o pré-tratamento com LDT5 inibiu de forma dose-dependente e completamente o aumento de PIU induzido por fenilefrina com um valor de  $E_{max}$  de  $102 \pm 11\%$  e um valor de  $DE_{50}$  de  $0,091 \mu\text{g/kg}$  ( $-\log DE_{50} = 1,037 \pm 0,15$ ). Observou-se o mesmo perfil para a tansulosina com um valor de  $E_{max}$  de  $114 \pm 7,6\%$  e um valor de  $DE_{50}$  de  $0,007 \mu\text{g/kg}$  ( $-\log DE_{50} = 2,133 \pm 0,11$ ).

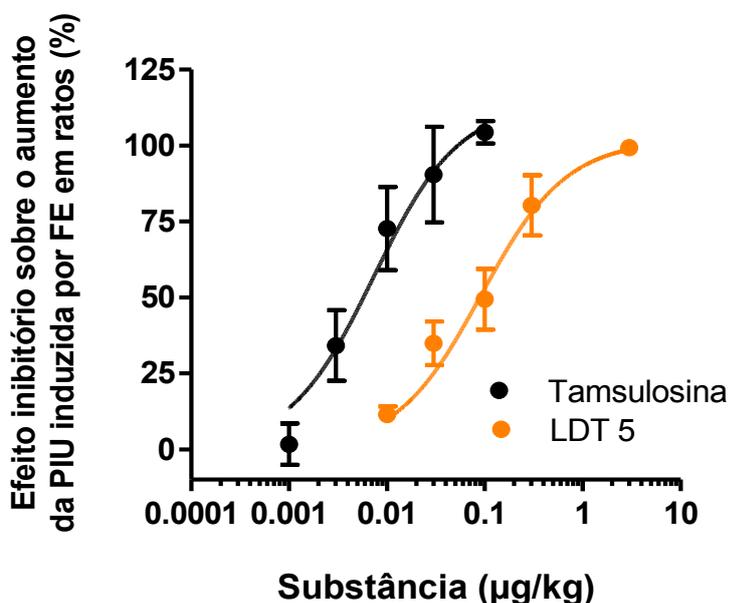


Figura 34. Curvas dose-resposta ao LDT5 e tansulosina sobre o aumento da pressão intra-uretral (PIU) de ratos induzido por fenilefrina (FE, 30 µg/kg). Os dados são expressos como percentual (%) de inibição (média ± SEM, n = 3-8 replicatas).

#### IV.E.3. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

A pressão arterial média (PAM) antes da administração por via intravenosa dos antagonistas AR- $\alpha_1$  foi de  $130,2 \pm 4,9$  mmHg (n = 21), a qual está de acordo com a literatura para este modelo animal (SCHLEIFFER e cols., 1991). A administração intravenosa (em bolus) de tansulosina (0,01 µg/kg), LDT3 ou LDT5 (0,1 µg/kg) levou a uma pequena redução da PAM ( $-0,67 \pm 1,10\%$ , n = 3;  $-2,92 \pm 1,08$ , n=6; e  $-2,13 \pm 0,61\%$ , n=6; respectivamente). Porém, esses efeitos não foram significativamente diferentes da redução observada após a administração de solução salina (controle:  $-1,74 \pm 2,96\%$ , n = 6;  $P = 0,90$ ; ANOVA) (Fig.35).

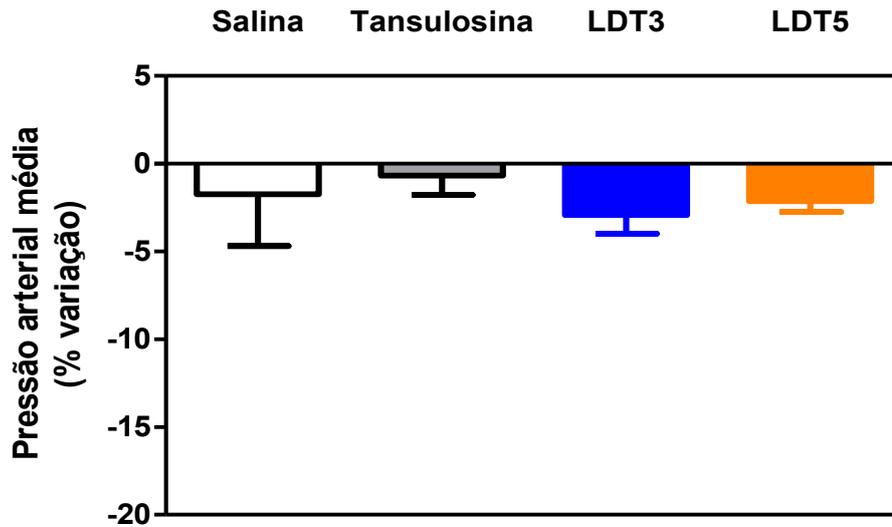
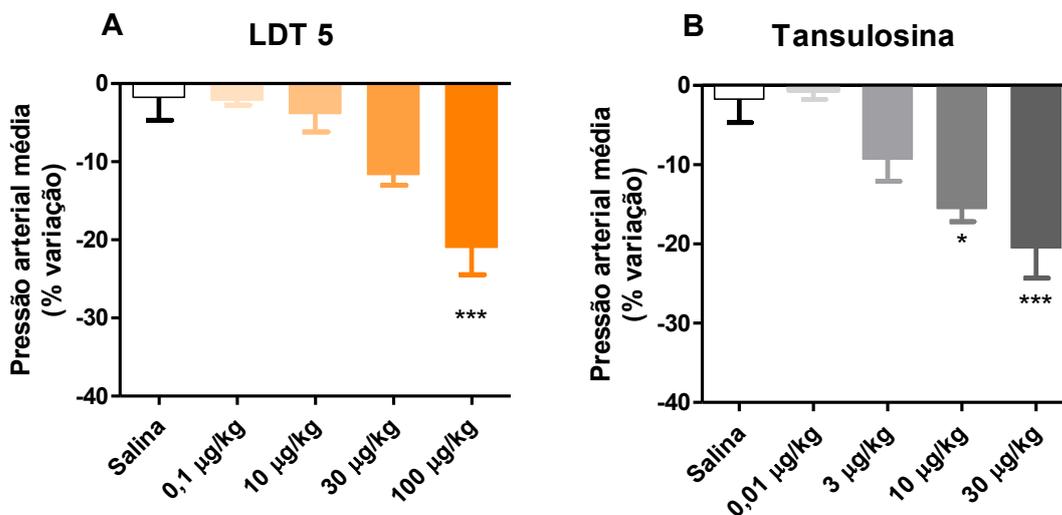


Figura 35: Variação de pressão arterial média em ratos após administração intravenosa em bolus de antagonistas AR- $\alpha$ 1: Tansulosina (0,01  $\mu$ g/kg), LDT3 ou LDT5 (0,1  $\mu$ g/kg), ou veículo (salina). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M. da variação em porcentagem em relação ao valor basal (pré-tratamento). Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA fator único).

Além disso, investigou-se o efeito de doses mais elevadas de LDT5 e tansulosina. Embora não seja estatisticamente significativo, uma pequena redução (12%) da pressão arterial foi observada quando se usou 30  $\mu$ g/kg do LDT5 (Fig. 36 A, C). No entanto, este efeito foi maior (20,9  $\pm$  3,4%,  $n = 5$ ) com a dose de 100  $\mu$ g/kg ( $P < 0,001$  em comparação com solução salina). O mesmo foi observado para a tansulosina, utilizando doses três vezes mais baixas do que as utilizadas para LDT5 (Fig. 36 B, C).



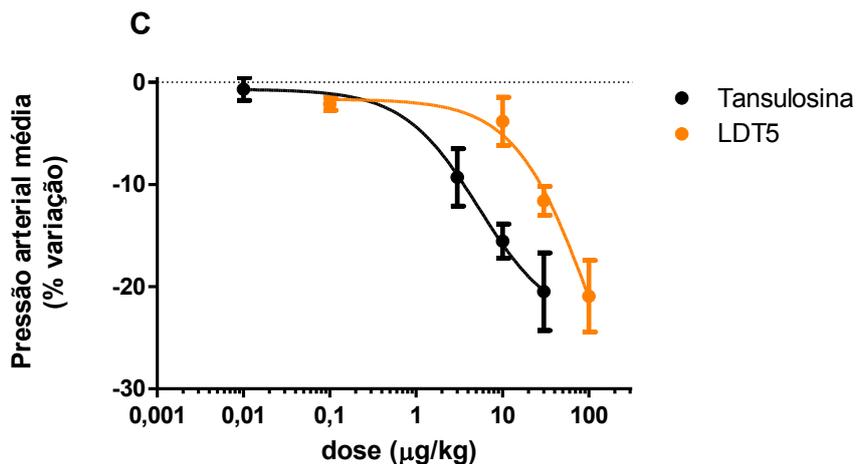


Figura 36: Variação da pressão arterial média em ratos após a administração de diferentes doses, por via intravenosa em bolus, de: LDT5 (A) ou tansulosina (B). (C) Variação da pressão arterial média representada em curva dose-resposta. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. da variação percentual em relação ao valor de base (pré - tratamento) ( $n = 3-6$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  contra solução salina, ANOVA fator único seguida do teste post - hoc de Dunnett.

#### IV.F. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS)

A proliferação das células DU-145 aumentou quando elas foram estimuladas durante 48 horas por via  $\alpha_1$  adrenérgica (fenilefrina (FE) 3  $\mu$ M: aumento médio de 44,9% acima do basal,  $P < 0,001$ ) ou por via serotoninérgica (serotonina (5-HT) 1  $\mu$ M: aumento médio de 47,4% acima do basal,  $P < 0,001$ ) (Fig. 37). A co-incubação com antagonistas de AR- $\alpha_{1D}$  (BMY7378 50 nM) ou do receptor de 5-HT $_{1A}$  (*p*-MPPF 50 nM) durante 48 horas bloqueou este efeito proliferativo, sugerindo a participação destes receptores no efeito de crescimento celular. De forma semelhante aos controles BMY7378 e *p*-MPPF, a co-incubação com LDT3 e LDT5 (50 nM por 48 horas), inibiu o crescimento celular induzido por agonistas dos AR- $\alpha_1$  e receptores 5-HT $_{1A}$ .

Contudo, a incubação apenas com LDT3 e LDT5 50 nM (48 horas), *i.e.*, na ausência dos agonistas, não promoveu qualquer alteração sobre a proliferação celular basal, descartando um efeito citotóxico nestas condições. Por outro lado, o LDT8 (5 ou 50 nM) induziu crescimento celular (5 nM: aumento de 102,2% em relação ao controle,  $P < 0,05$ ; Fig. 37, A e B). Corroborando com tais resultados, observamos resultados qualitativamente

semelhantes quando realizamos ensaios de contagem de células pelo ensaio de exclusão do Azul de Trypan (Fig 38).

Tal resultado corrobora com os resultados de atividade intrínseca nos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> onde o LDT8 se comportou como agonista parcial desses receptores (Fig. 26; Tabela 8).

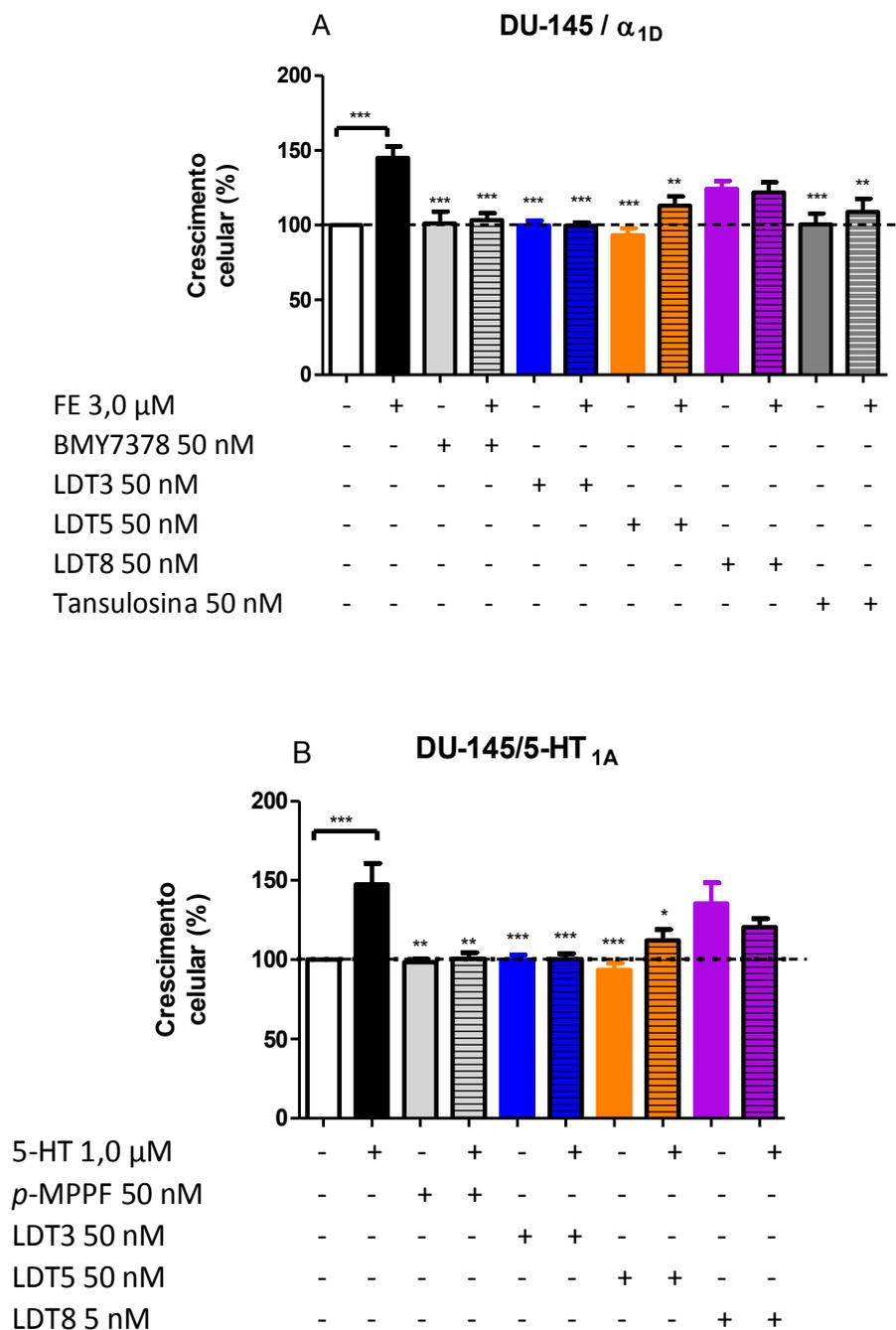


Figura 37. Inibição do crescimento de células DU-145 por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de MTT.

BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de 5-12 experimentos independentes realizados em quintuplicata. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett). Os valores são expressos em % do controle (basal)

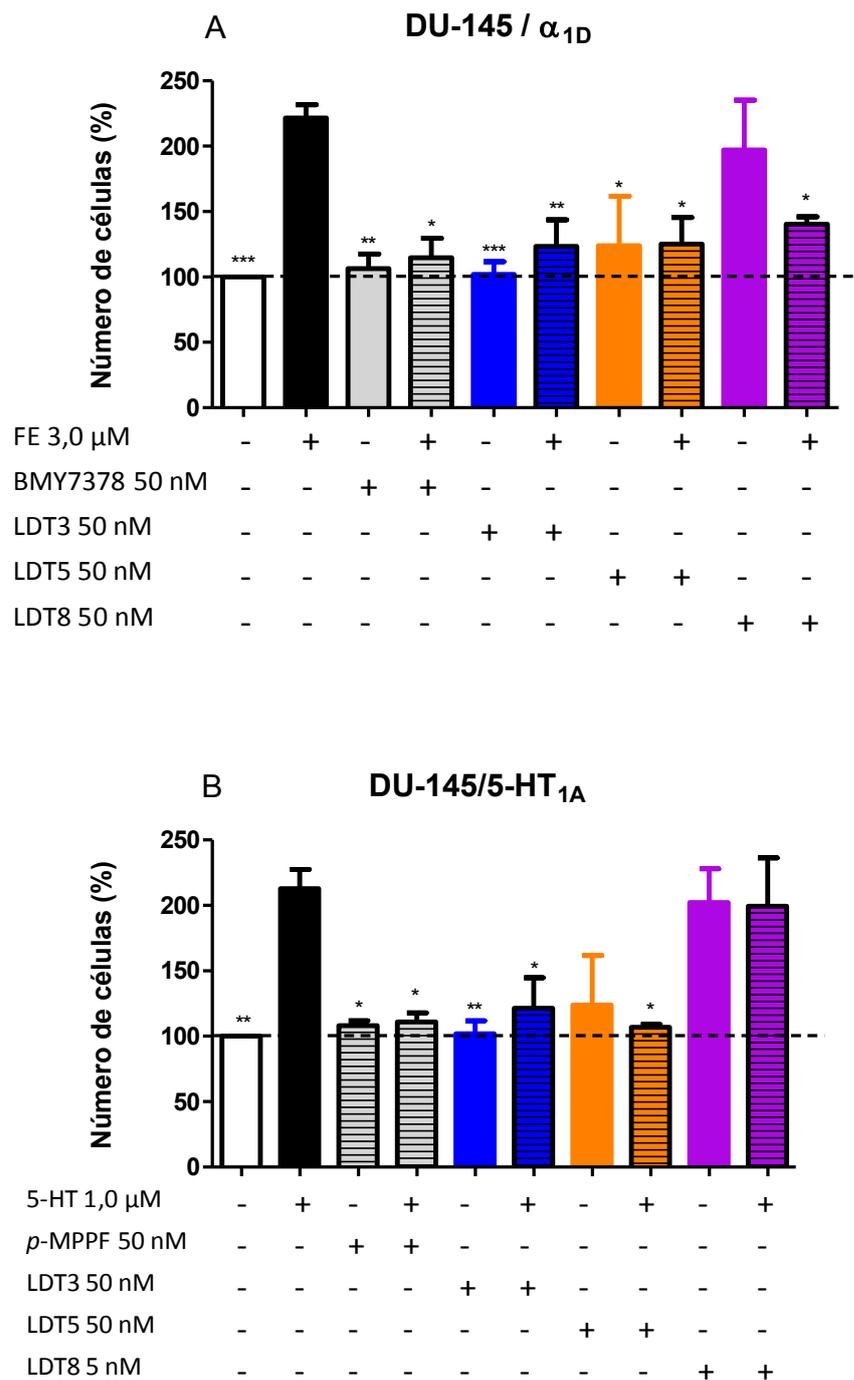


Figura 38. Inibição do crescimento de células DU-145 por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina (FE) 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de exclusão do Azul de Trypan. BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de 2-5 experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett).

Em seguida, avaliamos o efeito dos LDTs sobre o crescimento de células oriundas de pacientes com HPB, visando uma maior translacionalidade dos nossos dados. De acordo com os dados obtidos nos ensaios de MTT e exclusão de Azul de Trypan utilizando as células hiperplásicas humanas (HPB), um padrão similar de crescimento celular foi observado após estímulo com fenilefrina e 5-HT. Fenilefrina (3  $\mu$ M) e 5-HT (3  $\mu$ M) promoveram o aumento do número de células em 55,7% e 46,4%, respectivamente ( $P < 0,01$ ) (Fig 39, A e B respectivamente; Fig 40).

A incubação com o antagonista do AR- $\alpha_{1D}$  BMY7378 50 nM inibiu o efeito da FE ( $P < 0,001$  e  $P < 0,05$ , MTT e exclusão de Azul de Trypan, respectivamente) (Fig 37A e 38A). A co-incubação com LDT3 (50 nM) e LDT5 (50 nM) também bloqueou completamente o aumento do número de células das células hiperplásicas induzido pela FE ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ , MTT e exclusão de Azul de Trypan, respectivamente) (Fig 39A e 40A). Vale ressaltar que neste modelo a tansulosina (5 nM) não teve efeito (Fig.40A).

Para os receptores 5-HT $_{1A}$ , a estimulação com 5-HT (3  $\mu$ M) foi completamente bloqueada pelo antagonista seletivo *p*-MPPF (50 nM; 48 horas) ( $P < 0,001$ ) (Fig. 39B e 40B). Da mesma forma, LTD3 e LDT5 (50 nM; 48 horas) bloquearam completamente a proliferação induzida por 5-HT ( $P < 0,001$ ).

Contudo, LDT3 e LDT5 (50 nM, 48 horas) não alteraram o aumento basal do número de células (Fig. 37, 38, 39 e 40) mais uma vez descartando o efeito citotóxico em uma célula de origem humana (HPB).

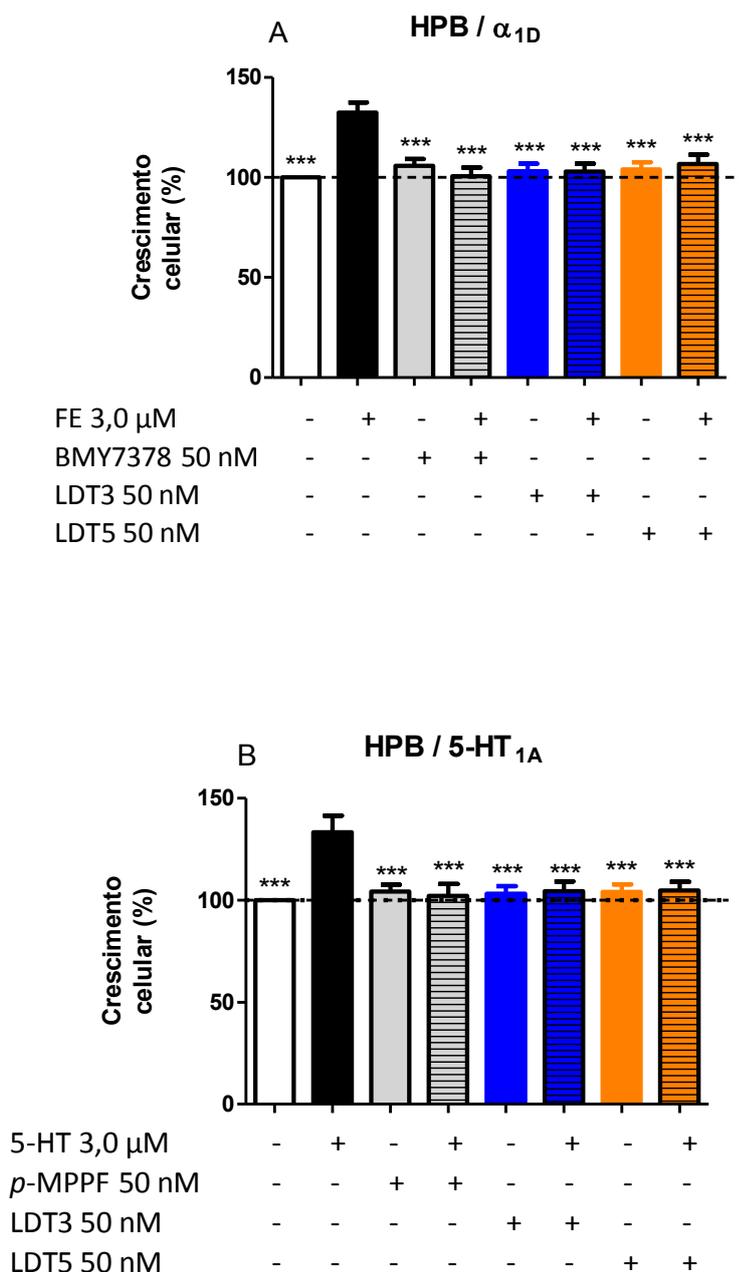


Figura 39. Inibição do crescimento de células oriundas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de MTT.

BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de 5-12 experimentos independentes realizados em quintuplicata. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett).

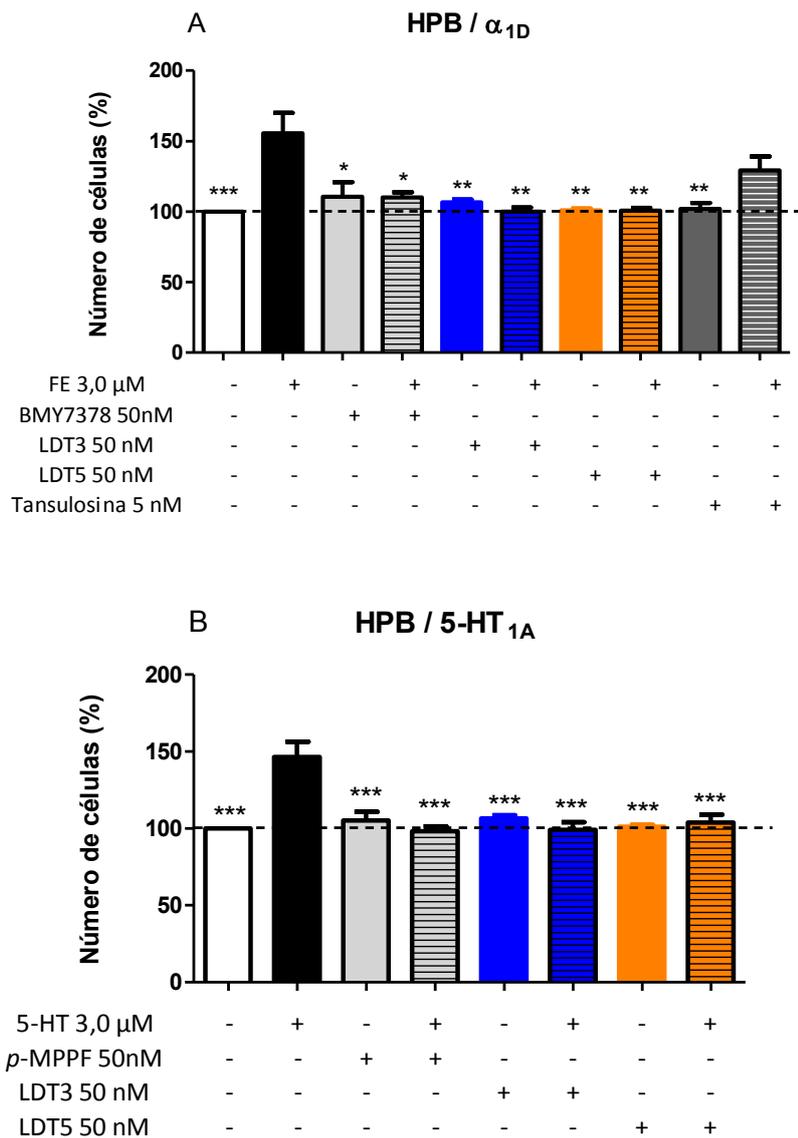


Figura 40. Inibição do crescimento de células oriundas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) por LDT3 e LDT5. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina 3  $\mu$ M (A) ou 5-HT 1  $\mu$ M (B) e avaliado pelo ensaio de exclusão do Azul de Trypan.

BMY 7378 e p-MPPF foram usados como antagonistas seletivos de AR- $\alpha_{1D}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente.

Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de 3-7 experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett).

#### **IV. G. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA**

Avaliou-se, após o tratamento com os LDTs (50 nM), BMY7378 (50 nM) (antagonista AR- $\alpha_{1D}$  seletivo), tansulosina (5nM) (antagonista AR- $\alpha_{1A}$  “seletivo”), ou PBS (veículo de diluição das substâncias), as alterações na morfologia celular causadas pelos tratamentos. Para isso, utilizou-se a toxina faloidina para marcação dos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto.

A análise qualitativa de imagens de microscopia confocal (Fig. 41) sugere que LDT3 e LDT5 (50 nM, 48 horas) não alteram a morfologia celular (Fig. 41, coluna à esquerda), já que não houve alteração da marcação com faloidina em relação ao controle.

Simultaneamente, avaliou-se, mais uma vez, a atividade proliferativa das células através da imunomarcação para o antígeno ki67, uma proteína nuclear, expressa nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular e ausente na fase G0 e, em células quiescentes. Não houve qualquer alteração do crescimento basal das células quando tratadas somente com os LDTs (Fig. 41, coluna à esquerda), evidenciado pelo número de núcleos marcados (DAPI) em cada condição, corroborando com o observado em outros ensaios. Notou-se a presença do antígeno ki67, mesmo como marcações tênues, e isso é estritamente associado à progressão do ciclo celular. Desta forma então, descarta-se, mais uma vez, o efeito citotóxico dos LDT3 e LDT5 em uma célula de origem humana (HPB).

Pode-se notar também, pelo maior número de núcleos marcados com DAPI, a indução de proliferação pelo tratamento com agonista de AR- $\alpha_1$  fenilefrina (Fig. 41, coluna à direita), e que tal proliferação é bloqueada com a adição dos LDTs de maneira semelhante ao observado com o BMY7378.

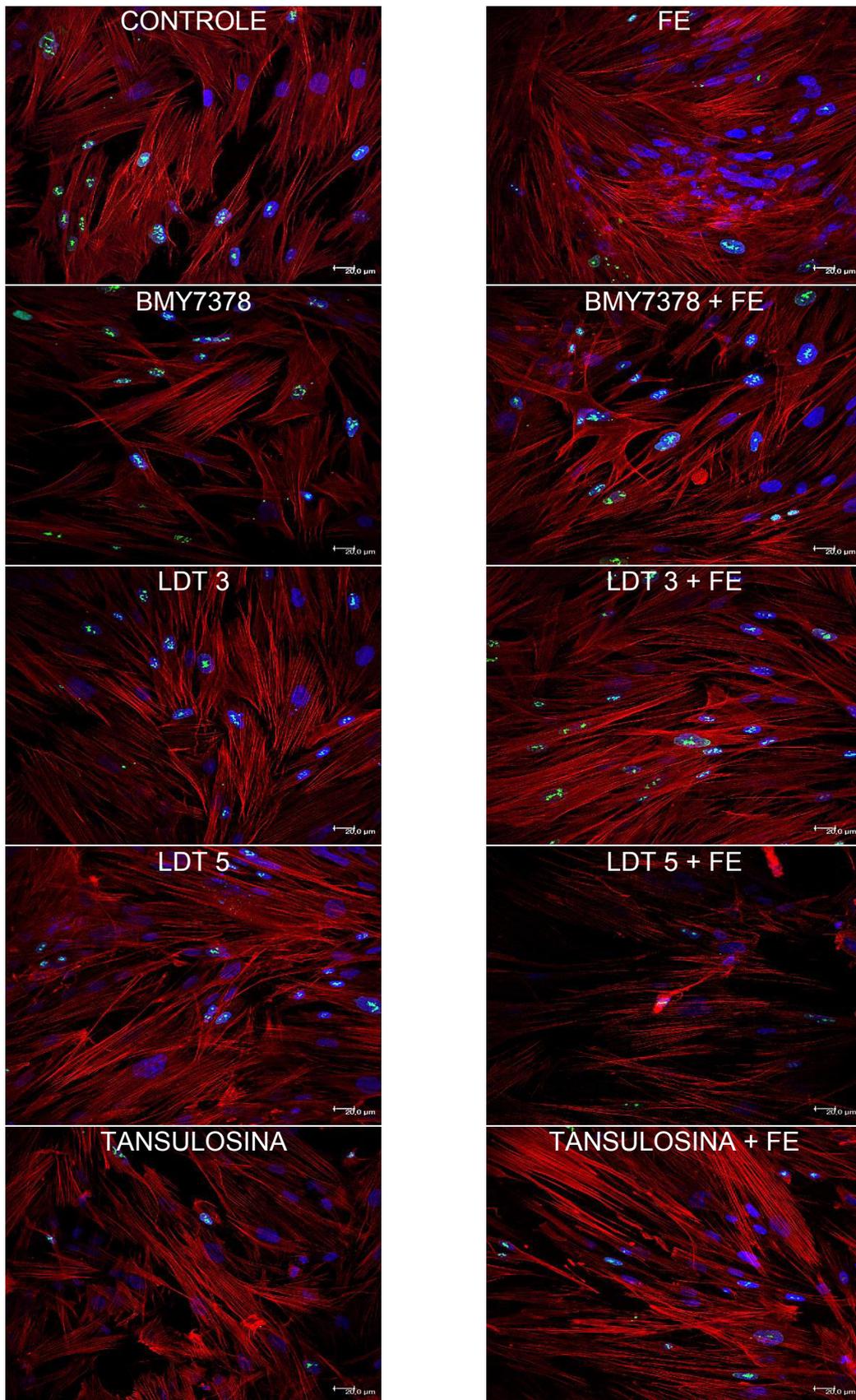


Figura 41. Micrografia das células estromais de hiperplasia prostática benigna. Marcações: Vermelho - faloidina (filamentos de actina); Azul - DAPI (sonda marcadora de DNA); Verde - Ki-67 (marcador de proliferação celular). Inibição da proliferação celular induzida por via adrenérgica (Fenilefrina (FE) 3  $\mu$ M), em células de pacientes

*portadores de HPB, por BMY7378, LDT 3, LDT 5 (50 nM) e tansulosina (5 nM).  
Imagens representativas. Grupo controle: tratado somente com o veículo de diluição  
das substâncias utilizadas neste ensaio (PBS). Barras correspondem a 20  $\mu$ m -  
Microscopia confocal (LSM510 Meta Zeiss Laser Scanning confocal microscope).*

#### **IV.H. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS) – TRANSATIVAÇÃO DE EGFR POR AR- $\alpha_{1D}$**

Buscando elucidar o mecanismo molecular pelo qual a ativação dos AR- $\alpha_{1D}$  levaria a proliferação das células HPB, avaliamos a possível interação dos AR- $\alpha_{1D}$  com a via do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), em um processo conhecido como transativação.

A pré-incubação das células HPB com todos os inibidores da via de transativação de EGFR inibiu a proliferação celular induzida por fenilefrina com amplitude de efeito semelhante ao observado anteriormente com o bloqueio do AR- $\alpha_{1D}$  (Fig. 42). Estes inibidores não tiveram efeito inibitório na ausência de fenilefrina sobre as células HPB, desta forma descartando um efeito inibitório inespecífico.

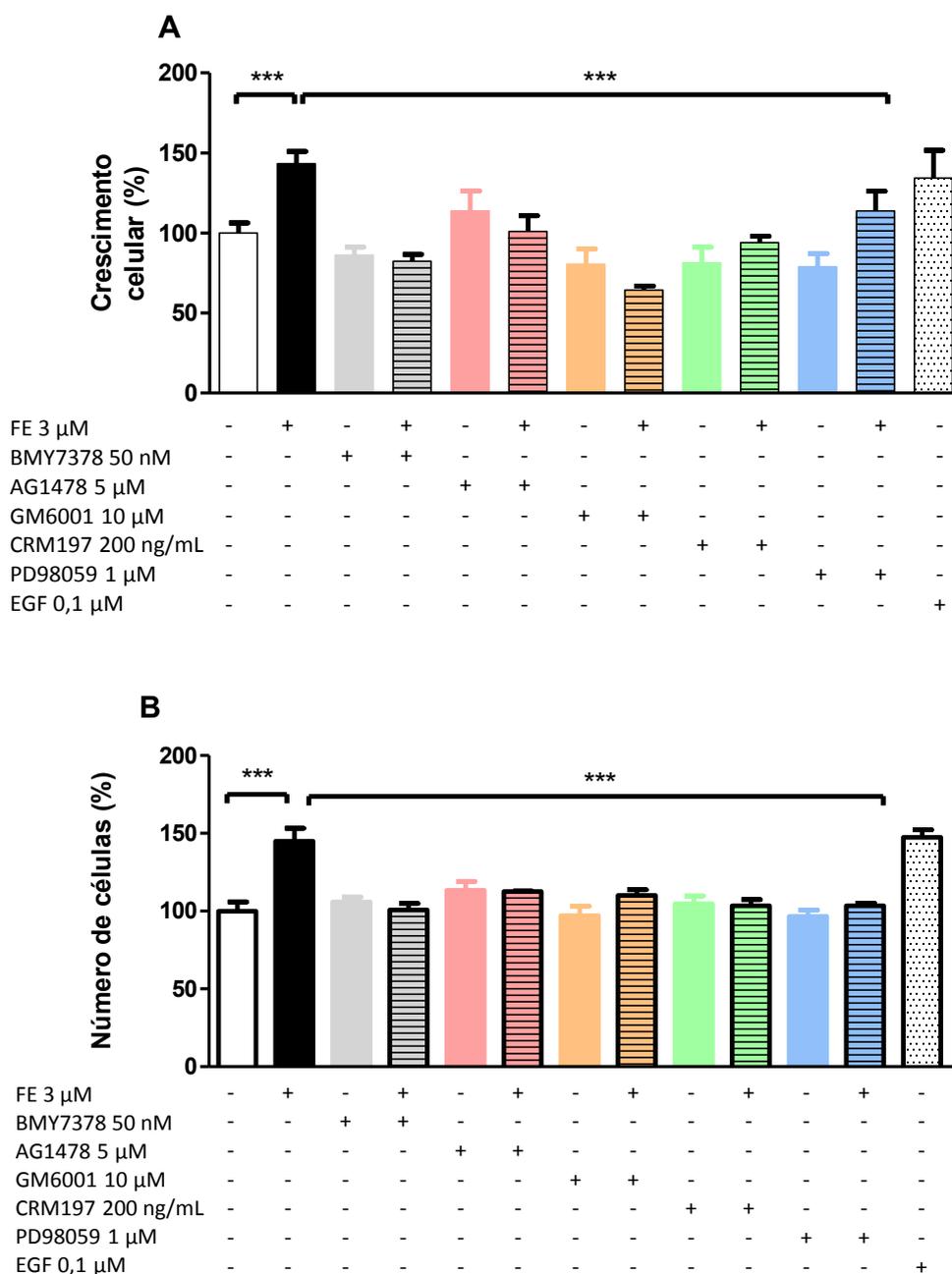


Figura 42. Inibição do crescimento de células oriundas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) por inibidores das vias de sinalização intracelulares envolvidas na transativação de EGFR. O crescimento celular foi induzido por fenilefrina (FE) 3  $\mu$ M e avaliado pelo ensaio de MTT (A) e exclusão do Azul de Trypan (B). Foram usados: AG1478 5  $\mu$ M, como antagonista de EGFR; GM6001 10  $\mu$ M como inibidor de metaloproteínase; PD98059 1  $\mu$ M como inibidor de MEK; ou CRM197 200 ng/mL como inibidor específico da HB-EGF. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de 3-5 experimentos independentes realizadas em triplicata ou quadruplicata. \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o agonista sozinho (ANOVA fator único seguido do teste post hoc de Dunnett).

## IV. I. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS LDTs SOBRE A VIA DAS MAP-KINASES

A avaliação da atividade da via da ERK 1/2 em células estromais provenientes de pacientes portadores de HPB foi realizada por *Western blotting*. A expressão de p-ERK 1/2 (forma ativada) na condição basal foi considerada como 100%. O tratamento com fenilefrina 100  $\mu$ M (15 minutos) aumentou a atividade da p-ERK 1/2 em 44%,  $P < 0,001$ ) (Fig. 42). Contudo não houve alteração da expressão da ERK total. Tal ativação foi bloqueada pelo pré-tratamento das células (10 minutos antes da adição da fenilefrina) com LDT3 e LDT5 (1  $\mu$ M) (Fig. 43).

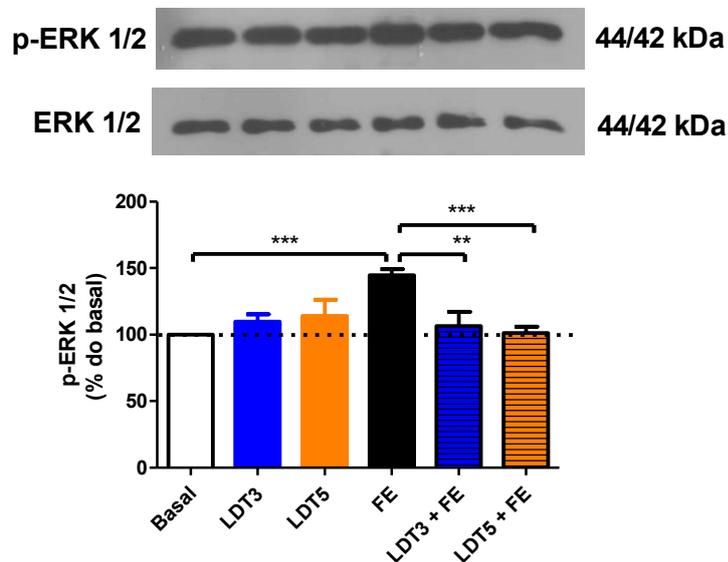


Figura 43. LDT3 e o LDT5 inibem a ativação de ERK-1/2 induzida por fenilefrina. Células HPB foram estimuladas com fenilefrina (100  $\mu$ M, 15 min) na ausência ou presença de LDT3 e LDT5 (1  $\mu$ M; pré-incubação de 10 min). Painel superior: Os lisados celulares foram analisados por imunoblotting para p-ERK-1/2 e ERK-1/2 total (experimento típico). Painel inferior: Dados da análise densitométrica. Os dados (expressos como média  $\pm$  SEM) foram normalizados em relação ao basal considerado 100% (n=3-4).

*Discussão*

---

---

### ✓ POTENCIAL TEÓRICO

No processo de desenvolvimento de fármacos, o uso de filtros teóricos tais como a “Regra dos 5” e “Eficiência do Ligante” (EL) permite a seleção de substâncias candidatas com maior potencial teórico de sucesso (ou *drug likeness*) (GHOSE e cols., 1999; LIPINSKI e cols., 2001; HOPKINS e cols., 2014). LDT3, LDT5 e LDT8, em sua forma não ionizada, satisfazem aos quatro parâmetros definidos pela “Regra dos 5”. Desta forma, LDT3, LDT5 e LDT8 são candidatos a fármacos com potencial atividade por via oral, uma vez que, segundo LIPINSKI e cols. (1997), estes parâmetros físico-químicos estão associados com a solubilidade em meio aquoso e permeabilidade intestinal. Além disso, segundo a análise de EL, a qual considera propriedades físico-químicas e farmacológicas (potência) do ligante, LDT3, LDT5 e LDT8 estão dentro da faixa de valores encontrados para vários fármacos em uso clínico com diferentes alvos farmacológicos (HOPKINS e cols., 2014), sugerindo que eles possuem boa eficiência de ligação aos adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

### ✓ SELETIVIDADE

Durante minha dissertação de mestrado (NASCIMENTO, 2011), uma série de derivados *N*-fenilpiperazínicos (LDTs) tiveram suas afinidades avaliadas para os AR- $\alpha_{1A}$ , por meio de ensaio de ligação (*binding*) utilizando preparações membranares de fígado de coelho. Nesta ocasião os LDT3, LDT5 e LDT8 foram selecionados por apresentarem alta afinidade para este receptor alvo (LDT3:  $K_i = 4,63$  nM, LDT5:  $K_i = 3,67$  nM e LDT8:  $K_i = 3,76$  nM). Estas afinidades foram cerca de 10 vezes mais baixas do que as apresentadas pela prazosina ( $K_i = 0,243$  nM), mas estes três substâncias apresentaram uma seletividade muito maior do que a prazosina quando comparada a afinidade pelos AR- $\alpha_{1B}$  (LDT3:  $K_i = 73$  nM, LDT5:  $K_i = 12$  nM e LDT8:  $K_i = 9,07$  nM), receptores não alvos no contexto deste estudo (NASCIMENTO, 2011). Desta forma, estes três moléculas foram selecionadas para esta Tese de Doutorado. De fato, a hipotensão postural é um importante efeito adverso relacionado aos

antagonistas AR- $\alpha_1$  utilizados atualmente na clínica para o tratamento da HPB. As causas envolvidas na ocorrência deste efeito adverso podem incluir aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (*i.e.*, bloqueio dos adrenoreceptores  $\alpha_1$ ), que não são mutuamente exclusivos (MICHEL & VRYDAG, 2006). Contudo, o bloqueio de AR- $\alpha_{1B}$  é um dos fatores considerados na indução da hipotensão postural, a qual pode ser mais pronunciada em pacientes idosos, uma vez que a expressão em vasos de resistência deste subtipo de receptor aumenta com o envelhecimento (RUDNER e cols., 1999; MICHEL & VRYDAG, 2006, LEPOR, 2007). Nessa mesma condição experimental, a tansulosina mostrou um valor  $K_i$  de 5,9 nM para AR- $\alpha_{1B}$  (CHAGAS-SILVA e cols., 2014). Portanto LDT3, LDT5 e LDT8 apresentam menor afinidade para os AR- $\alpha_{1B}$  do que tansulosina, fármaco utilizado na clínica para o tratamento da HPB, correspondendo a uma vantagem para esses LDTs frente à tansulosina.

A próstata contém um componente estromal formado por células musculares lisas e um componente glandular composto por células epiteliais, dentre outros elementos. A proporção de músculo liso e elementos glandulares varia entre as espécies, sendo que a próstata humana possui a maior proporção do componente estromal. Além disso, a hiperplasia prostática histológica é associada ao aumento de músculo liso estromal (revisto em MICHEL & VRYDAG, 2006).

De acordo com ensaios de RT-PCR em tempo real, imunohistoquímica, ensaios de ligação (*binding*) e ensaios funcionais realizados com próstata humana, o AR- $\alpha_{1A}$  é o subtipo predominante. Este subtipo está presente no estroma (e no componente glandular) e induz contração muscular (FAURE e cols., 1994, FORRAY e cols., 1994, PRICE e cols., 1993; WALDEN e cols., 1997). Os dados da literatura sugerem a proporção de 70:0:30% para os subtipos AR- $\alpha_{1A}$ , AR- $\alpha_{1B}$  e AR- $\alpha_{1D}$  (revisto em MICHEL & VRYDAG, 2006). Na hiperplasia prostática benigna há aumento do RNAm de AR- $\alpha_1$ . O AR- $\alpha_{1A}$  é também altamente expresso na próstata hipertrófica porém neste caso há também aumento da expressão de AR- $\alpha_{1D}$  (NASU e cols., 1996, MICHEL & VRYDAG, 2006).

O AR- $\alpha_{1A}$  também é o subtipo predominante na próstata do rato, sendo responsável pela contração (SCOFIELD e cols., 1995). A afinidade aparente dos LDT3, LDT5 e LDT8 também foi avaliada utilizando um ensaio funcional com próstata de rato, onde pudemos não somente confirmar a elevada afinidade dos LDTs pelos AR- $\alpha_{1A}$ , mas também pudemos determinar sua atividade intrínseca, caracterizando estes LDTs como antagonistas destes receptores. Com base nestes resultados, LDT3, LDT5 e LDT8 ( $K_B = 2,62$  nM; 0,18 nM; 0,17 nM, respectivamente) apresentam uma afinidade 20 a 60 vezes menor para AR- $\alpha_{1B}$  quando comparamos as afinidade para os AR- $\alpha_{1A}/\alpha_{1D}$ , o que nos indica um bom perfil de seletividade em relação a este receptor não alvo, reduzindo assim as chances de efeitos adversos tais como hipotensão.

Receptores adrenérgicos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Nesta família também se encontram os receptores muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. Resumidamente, considerando o genoma humano e de acordo com a análise filogenética, estes receptores pertencem ao subgrupo da família rodopsina (HIBERT e cols., 1991). Uma característica de GPCRs da família rodopsina que pode afetar a afinidade de fármacos é o fato dos segmentos transmembranares (TM) dos GPCRs apresentarem considerável identidade e similaridade estrutural, incluindo adrenoceptores, receptores 5-HT $_{1A}$  e receptores dopaminérgicos (HIBERT e cols., 1991). As regiões mais preservadas são os TM e as alças extracelulares. A região com maior diversidade nos GPCRs é a extremidade extracelular aminoterminal que apresenta  $62 \pm 98$  (média  $\pm$  DP) resíduos de aminoácidos (KARNIK e cols., 2003) (Fig. 44).

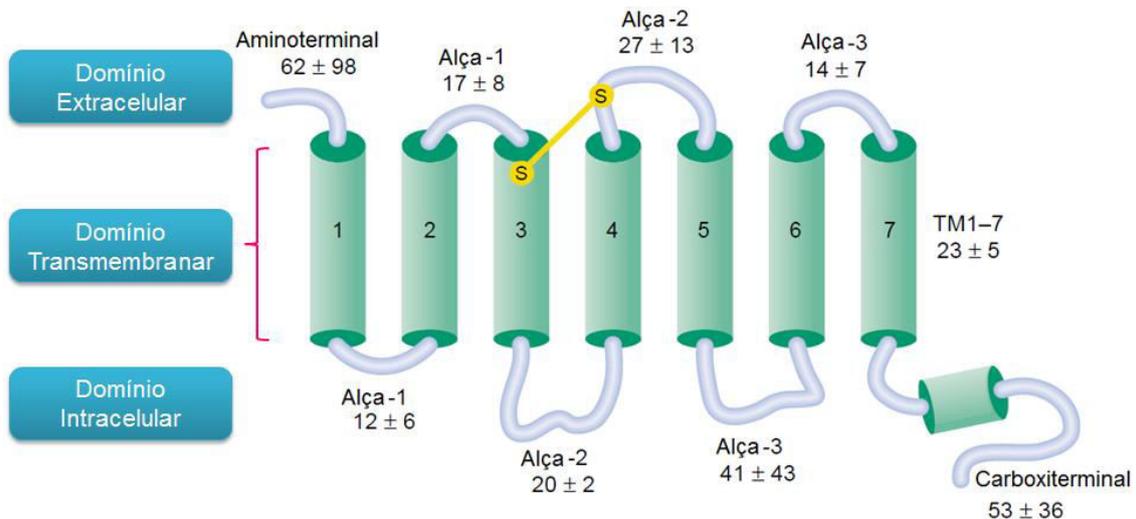


Figura 44. Representação da estrutura secundária de GPCRs. A ponte dissulfeto (amarelo) que liga TM3 e ECL2 é conservado em 91,8 % dos GPCRs, mas ausente em 7,6 % de membros da família rodopsina. Abreviaturas: TM – segmento transmembranar. Os números indicam o número de resíduos em cada região (média ± DP) Modificado de KARNIK e cols., 2003.

A região TM é hidrofóbica e corresponde à região responsável pelo reconhecimento do ligante (OLDHAM & HAMM, 2008). Há uma relação estrutural entre os ligantes conhecidos desses receptores que em geral correspondem a pequenas moléculas de aminas com uma região aromática (FREDRIKSSON e cols., 2003), tornando um desafio o desenvolvimento de ligantes seletivos. Ensaios de mutagênese sugerem que resíduos Asp<sup>3,32</sup> na TM3, o qual é conservado nos GPCRs, é importante para a interação de ligantes através da amina protonada. Além disso, o grupamento hidroxila presente em neurotransmissores e fármacos podem interagir através de ligação de hidrogênio com resíduos Ser/Thr na TM5 (LÓPEZ-RODRÍGUEZ e cols., 2002). Desta forma se fez necessário o mapeamento de possíveis afinidades por receptores estruturalmente semelhantes que poderiam ser alvo dos LDTs e que poderiam causar efeitos adversos.

Anteriormente já haviam sido avaliados como receptores não-alvo, além dos AR- $\alpha_{1B}$ , os receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Tabela 11). Todos os LDTs tinham afinidades menores para estes receptores quando comparávamos aos receptores 5HT<sub>1A</sub> (NASCIMENTO, 2011, dissertação de mestrado).

Tabela 11: Resumo dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores não-alvos.

LDTs	Receptor				
	AR- $\alpha_{1B}$ $K_i$ (nM) <sup>A</sup>	AR- $\alpha_2$ $K_i$ (nM)	5-HT <sub>2A</sub> $K_i$ (nM) <sup>B</sup>	D <sub>2</sub> -“like” $K_i$ (nM)	Muscarínico $K_i$ (nM)
LDT3	73 <sup>A</sup>	930	45 <sup>B</sup>	186	56700
LDT5	12 <sup>A</sup>	240	248 <sup>B</sup>	100	108000
LDT8	9,07 <sup>A</sup>	550	254 <sup>B</sup>	6	33900

<sup>A, B</sup> Os valores de  $K_i$  foram determinados durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado através de ensaios de competição, utilizando a [<sup>3</sup>H]-prazosina e [<sup>3</sup>H]-ketanserina como radioligantes para AR- $\alpha_{1B}$  e 5-HT<sub>2A</sub>, respectivamente (NASCIMENTO, 2011).

Neste estudo, seguiu-se com a avaliação de outros receptores não alvo (AR- $\alpha_2$ , receptores muscarínicos e receptores dopaminérgicos (D<sub>2</sub>-“like”). Para esses três receptores não-alvo verificou-se que os LDTs apresentaram valores elevados de  $K_i$ , perto da faixa micromolar, para os AR- $\alpha_{2A}$ , receptores muscarínicos e receptores D<sub>2</sub>-“like” (Tabela 11). Exceto LDT8 que apresentou uma afinidade relativamente elevada para os receptores D<sub>2</sub>-“like”, com um valor de  $K_i$  de 6 nM.

Estudos anteriores mostraram efeitos sobre AR- $\alpha_2$  poderiam estar relacionados com a regulação dos sistema nervoso central, sistema cardiovascular e genitourinário masculino, onde receptores pré-sinápticos inibem a liberação de catecolamina a partir de nervos simpáticos (HEIN e cols., 1999; KONTANI e cols., 2000; MICHEL & VRYDAG, 2006). Em relação ao AR- $\alpha_2$  o LDT5, por exemplo, apresentou uma afinidade 1333 vezes maior para AR- $\alpha_{1A}$  e 407 vezes maior para AR- $\alpha_{1D}$ , tendo uma boa seletividade entre os receptores, o que sugere uma menor propensão a causar efeitos adversos relacionados a esses receptores (tabela 12).

Tabela 12: Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os AR- $\alpha_2$ .

Receptor LDTs	AR- $\alpha_2$ K <sub>i</sub> (nM)	AR- $\alpha_2$ / AR- $\alpha_{1A}$	AR- $\alpha_2$ / AR- $\alpha_{1D}$
LDT3	930	355	477 <sup>A</sup>
LDT5	240	1333	407 <sup>A</sup>
LDT8	550	3235	3055 <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Os valores de K<sub>i</sub> foram determinados durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado através de ensaios funcionais em aorta de rato (NASCIMENTO, 2011).

Já ações sobre os receptores muscarínicos, podem acarretar eventos cardiovasculares, glandulares, constipação e sonolência, por exemplo (ANDERSSON & WEIN, 2004; YAMADA e cols., 2011). Em relação aos receptores muscarínicos essa seletividade é ainda maior, por exemplo, o LDT5 apresentou uma afinidade 60000 vezes maior para AR- $\alpha_{1A}$  e 18305 vezes maior para AR- $\alpha_{1D}$ , sendo ainda mais seletivos entre esses receptores (tabela 13).

Tabela 13: Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores muscarínicos.

Receptor LDTs	Muscarínicos K <sub>i</sub> (nM)	Muscarínicos / AR- $\alpha_{1A}$	Muscarínicos / AR- $\alpha_{1D}$
LDT3	56700	21641	29076 <sup>A</sup>
LDT5	108000	60000	18305 <sup>A</sup>
LDT8	33900	199411	188333 <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Afinidades para AR- $\alpha_{1D}$  foram determinadas durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado através de ensaios funcionais em aorta de rato. (NASCIMENTO, 2011).

Em relação aos receptores D<sub>2</sub>-“like”, sabe-se que estes receptores estão envolvidos no comando central da ejaculação (GIULIANO, 2006) de tal forma que seu bloqueio poderia levar a problemas de ejaculação, como reportado para a tansulosina. De fato, em estudos clínicos, pacientes tratados com tansulosina (0,8 mg/dia) têm o volume ejaculado reduzido em quase 90% e cerca de 35% apresentam anejaculação (GIULIANO, 2008). Nota-se que existe controvérsia quanto a este aspecto já que outros estudos atribuem esses distúrbios ejaculatórios da tansulosina aos efeitos sobre AR- $\alpha_1$  (DE ALMEIDA

KIGUTI & PUPO, 2012). De qualquer forma, era importante averiguar a afinidade dos LDTs para este receptor. Apesar de não serem totalmente conclusivos por causa da limitação do ensaio utilizado (*binding* avaliando sobretudo receptores do tipo D<sub>2</sub>, predominante no estriado de rato, e não o subtipo D<sub>3</sub>, por exemplo), estes resultados indicam uma boa margem de segurança tendo em vista a afinidade muito menor para estes receptores do que para o receptor  $\alpha_{1A}$  (cerca de 70 e 550 vezes para LDT3 e LDT5, respectivamente) (Tabela 14).

Tabela 14: Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-“like”.

LDTs	Receptor	D <sub>2</sub> -“like” Ki (nM)	D <sub>2</sub> -“like” / AR- $\alpha_{1A}$	D <sub>2</sub> -“like” / AR- $\alpha_{1D}$
	LDT3		186	71
LDT5		100	555	170 <sup>A</sup>
LDT8		6	35	33 <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Afinidades para AR- $\alpha_{1D}$  foram determinadas durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado através de ensaios funcionais em aorta de rato. (NASCIMENTO, 2011).

Em relação aos receptores dopaminérgicos essa seletividade é menor para os LDT3 e LDT8, destacando-se o LDT5 que apresentou uma afinidade 555 vezes maior para AR- $\alpha_{1A}$  e 170 vezes maior para AR- $\alpha_{1D}$ , começando a apresentar um melhor perfil de afinidade, sendo mais seletivo pelos receptores alvos destes estudo. Cabe ressaltar que a tansulosina, antagonista AR- $\alpha_{1A}$  utilizado no tratamento da HPB, apresenta uma razão de apenas 2 vezes entre receptores dopaminérgicos e AR- $\alpha_{1A}$  (0,28 e 0,14 nM, respectivamente) (GIULIANO e cols., 2006; ANDERSSON & WYLLIE, 2003).

Em virtude da maior afinidade do LDT8 por receptores D<sub>2</sub>-like e sua atividade intrínseca em receptores 5-HT<sub>1A</sub> (ver adiante) esta substância não foi avaliada em etapas posteriores que visaram ampliar o conhecimento da ligação dos LDTs a outras proteínas não-alvo da HPB e de receptores de origem humana. Esta etapa é importante para a otimização da margem de segurança de novos candidatos à fármacos (BOWES e cols., 2012).

Realizamos um teste de afinidade (*ensaios de binding*) dos LDT3 e LDT5 para outros receptores, canais e enzimas totalizando 44 alvos selecionados, e que são recomendados por algumas empresas farmacêuticas. Os dados obtidos com LDT3 e LDT5 (1  $\mu\text{M}$ ) sugerem que estes não apresentam afinidade significativa para os outros alvos estudados incluindo o canal hERG  $\text{K}^+$  (ANEXO 2), cujo bloqueio pode provocar arritmia cardíaca grave (PRIEST e cols., 2008). Ensaios que avaliem a afinidade e/ou os efeitos sobre canais hERG  $\text{K}^+$  são necessários para a aprovação de novos fármacos por diversas autoridades reguladoras (BOWES e cols., 2012, PETERS 2013).

Até este momento do estudo todos os parâmetros de afinidade estavam sendo avaliados em adrenoreceptores de rato. Utilizando células Rat-1 transfectadas com os três subtipos de AR- $\alpha_1$  humanos e um ensaio funcional de medição de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pode-se confirmar que os LDTs atuavam como antagonistas destes receptores, mantendo sua elevada potência, o que reflete indiretamente a afinidade. Para AR- $\alpha_{1D}$  humanos, por exemplo, LDT3 e LDT5 apresentaram valores de  $\text{Cl}_{50}$  que variaram entre 1,8 e 4 nM.

Os LDTs também apresentaram alta afinidade por AR- $\alpha_{1A}$  humano, com valores de  $\text{pCl}_{50}$  de  $7,21 \pm 0,27$  e  $7,22 \pm 0,17$ , LDT3 e LDT5 respectivamente ( $n = 3$ ). Podemos notar que há uma diferença de potência ( $\text{pCl}_{50}$ ) dos LDTs em AR- $\alpha_{1A}$  quando comparamos os parâmetros obtidos neste ensaio e ensaio funcional de próstata de ratos ( $K_B$ ). Cerca de 330x para LDT5 e 24x para LDT3. Tal fato pode resultar das diferenças nas características dos AR- $\alpha_{1A}$  dependentes do tecido ou ambiente de ensaio (FORD e cols., 1997). Além disso, a concentração usada de fenilefrina foi muito mais alta no ensaio do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , logo é natural que se precise de mais antagonista para que haja a competição pelos receptores.

Contudo, corroborando com o observado anteriormente em receptores de rato, pode-se observar que em AR- $\alpha_{1B}$  humanos o LDT3 e LDT5 apresentaram menor potência com valores de  $\text{pCl}_{50}$  de  $6,2 \pm 0,23$  e  $5,9 \pm 0,28$  ( $n = 3$ ), respectivamente, em relação aos outros dois subtipos de receptores ( $P < 0,05$ ). Além disso, LDT3 e LDT5 também apresentaram menor potência quando comparados à tansulosina ( $8,8 \pm 0,1$  ( $n = 3$ );  $P < 0,05$ ) (Tabela 15).

Tabela 15: Comparação dos parâmetros farmacológicos dos LDTs para os AR- $\alpha_1$  humanos.

Receptor Substâncias	AR- $\alpha_{1B}$ CI <sub>50</sub> (nM)	AR- $\alpha_{1B}$ / AR- $\alpha_{1A}$	AR- $\alpha_{1B}$ / AR- $\alpha_{1D}$
LDT3	630	10	348
LDT5	1200	20	275
Tansulosina	1,58	0,4	ND

ND = Não determinado

Neste ensaio, pudemos observar que LDT3 e LDT5 apresentam uma afinidade maior por AR- $\alpha_{1A/1D}$  quando comparados a AR- $\alpha_{1B}$ . O mesmo não se aplica à tansulosina que, neste modelo de estudo, praticamente não distingue AR- $\alpha_{1A}$  e AR- $\alpha_{1B}$ . Tal fenômeno, pode estar relacionado com diferentes níveis de expressão dos receptores nesses modelos.

#### ✓ ATIVIDADE *IN VIVO*

Seguiu-se o estudo realizando testes *in vivo*. A princípio avaliou-se se os LDTs promoveriam algum efeito tóxico agudo quando administrados em doses elevadas. A avaliação de toxicidade é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar, em altas doses, danos aos organismos vivos (VALADARES, 2006), sendo sugerido que a avaliação sobre a potencial toxicidade seja realizada de forma precoce a fim de evitar investimentos desnecessários e aprofundamento de estudo com candidatos potencialmente tóxicos.

Os dados obtidos sugerem, de maneira preliminar, que LDT3 e LDT5 não induzem toxicidade aguda, uma vez que a administração intraperitoneal de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  não produziu qualquer mortalidade e não promoveu nenhuma alteração da temperatura corporal, ou alteração dos parâmetros analisados (Tabela 3, em materiais e métodos). Tais parâmetros poderiam ser relacionados a efeitos periféricos (por exemplo, hipotensão (via AR- $\alpha_1$ ), lacrimejamento (via AR- $\alpha_1$ ), mudança no padrão miccional (via AR- $\alpha_1$  e receptores dopaminérgicos e muscarínicos) e até mesmo centrais (tabela 16),

que poderiam acarretar em possíveis efeitos adversos decorrentes do bloqueio dos receptores a que estes LDTs apresentam afinidade.

Tabela 16: Os efeitos adversos que poderiam estar associados a um bloqueio central dos diferentes receptores acoplados à proteína G.

Receptor	Efeito colateral devido ao bloqueio dos receptores
AR- $\alpha_1$	Hipotensão, sedação, tontura
AR- $\alpha_2$	Ansiedade
5-HT <sub>1A</sub>	Alterações de temperatura
D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub>	Catalepsia
D <sub>1-like</sub> , D <sub>4</sub>	Mudanças no controle da micção
Muscarínico	Sedação

Tais parâmetros foram avaliados em um período de até 14 dias após a administração e não foi observado quaisquer efeitos adversos com estes derivados.

Na etapa seguinte do projeto avaliamos o efeito dos LDT3 e LDT5 sobre a PIU. Diferenças anatômicas entre a próstata humana e de animais de experimentação, impediram até o momento, o estabelecimento de um modelo animal ideal que reproduza as características hiperplásicas e de LUTS observadas na HPB. Porém, os ensaios de medida de PIU são utilizados para estimar a potência de novos fármacos *in vivo* (HIEBLE, 2011). Tal método baseia-se no fato de que a ativação de AR- $\alpha_1$  por um agonista, por exemplo a fenilefrina (FE), levaria a um aumento do tônus muscular liso prostático (e da uretra) o que culmina num aumento da PIU (AKIYAMA e cols., 1999). Em trabalho anterior AKIYAMA e colaboradores (1999) mostraram que a remoção da próstata compromete o aumento da PIU em cerca de 80% quando comparado ao animal com próstata intacta, e os valores de PIU na ausência da próstata se igualam aos valores observados em fêmeas.

A próstata corresponde a um tecido enriquecido em AR- $\alpha_{1A}$  funcionais tanto em humanos quanto em ratos (WALDEN e cols., 1999, SCOFIELD e cols., 1995). Nesse sentido, é possível verificar o papel de um antagonista AR- $\alpha_{1A}$  utilizando este modelo. Observou-se, inicialmente, que a FE foi capaz de aumentar a PIU de forma dose-dependente o que nos permitiu validar este protocolo experimental. A pré-administração, por via intravenosa, de LDT3 ou

LDT5 (0,1 µg/kg) impediu o aumento de PIU induzido pela fenilefrina (30 µg/kg). Neste ensaio, o LDT5 produziu uma maior inibição do aumento de PIU induzido por fenilefrina quando comparado ao LDT3 (Fig. 33), estando de acordo com sua maior afinidade por AR- $\alpha_{1A}$ , observada anteriormente (Tabela 1).

Posteriormente foram realizadas curvas dose-resposta ao LDT5. Verificou-se que em doses mais elevadas o LDT5 bloqueou totalmente o efeito da fenilefrina sobre a PIU. O mesmo foi observado para a tansulosina neste mesmo modelo experimental. Os valores médios de DE<sub>50</sub> foram 0,09 µg/kg e 0,007 µg/kg para LDT5 e tansulosina, respectivamente, corroborando com o observado anteriormente, uma vez que a tansulosina apresenta afinidade maior AR- $\alpha_{1A}$ . Assim, este resultado demonstra que LDT5 foi tão eficaz porém menos potente que o fármaco padrão utilizado no tratamento do LUTS sugestivo de HPB.

Considerando-se que a hipotensão arterial é um efeito adverso clássico de antagonistas de AR- $\alpha_1$ , principalmente em idosos, devido, em grande parte, ao antagonismo sobre AR- $\alpha_{1B}$  em vasos sanguíneos de resistência (TAKE e cols., 1998, SCHWINN e MICHELOTTI, 2000, NANDA e cols., 2009), avaliou-se o efeito de LDT3 e LDT5 sobre a pressão arterial basal de ratos. Ambos não promoveram uma redução na pressão arterial basal após a sua administração (0,1 µg/kg). Nem mesmo em dose mais elevada (10 µg/kg), LDT5 provocou qualquer impacto sobre a PAM basal. Esta dose é 100 vezes mais elevada do que a DE<sub>50</sub> para o efeito inibitório da LDT5 sobre o aumento induzido pela fenilefrina em PIU.

Assim, esses resultados sugerem que o LDT5 na mesma dose que reduz a PIU não causa hipotensão em ratos. Por conseguinte, em termos de efeitos adversos relacionados com a pressão arterial, LDT5 é um bom candidato para o tratamento da HBP e distúrbios associados.

#### ✓ **ATIVIDADE INTRÍNSECA – RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>**

Durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado (Nascimento, 2011) verificou-se que LDT2-6 e LDT8 apresentavam elevada afinidade (faixa

nM) pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, porém sua atividade intrínseca permaneceu indeterminada naquele momento. Esses dados de afinidade foram obtidos a partir de ensaios de *binding* utilizando o radioligante agonista [3H]-8-OH-DPAT. Segundo ASSIÉ e colaboradores (1999), é possível determinar a atividade intrínseca de um fármaco atuando em receptor GPCR através do cálculo da razão dos valores de  $K_i$  obtidos em experimentos de competição com radioligante antagonista *versus* radioligante agonista. GPCRs exibem conformações acoplada e desacoplada à proteína G, as quais exibem estados de alta e baixa afinidade ao agonista, respectivamente. A afinidade de antagonistas é semelhante para ambos os estados do GPCR. Desta 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 (LAHTI e cols., 1992; NOËL e cols., 2014).

Para os derivados LDT3 e LDT5 as duas curvas de competição foram sobrepostas (Fig. 27A e 27B) e os valores das razões de  $K_i$  foram próximos da unidade, o que sugere que estes derivados *N*-fenilpiperazínicos sejam antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Por outro lado, o LDT8 apresentou uma razão de  $K_i$  superior a unidade (~66) ainda que inferior ao valor obtido com 5-HT (~77), o que sugere que se trata de agonista parcial desses receptores.

#### ✓ AÇÃO ANTI-PROLIFERATIVA

A próstata hiperplásica humana mostra um aumento da expressão de AR- $\alpha_{1D}$  (KOJIMA e cols., 2006; NASU e cols., 1996), e KOJIMA e colaboradores (2009) sugerem um efeito benéfico do bloqueio deste receptor durante o tratamento de HPB, uma vez que o naftopidil (antagonista AR- $\alpha_{1D}$ ), um fármaco em uso clínico no Japão, poderia conter o crescimento celular.

Um outro tipo de receptor expresso em tecido prostático humano e envolvido com eventos proliferativos é o receptor 5-HT<sub>1A</sub> (DIZEYI e cols., 2004, SIDDIQUI e cols., 2006). Desta forma, os efeitos anti-proliferativos atribuídos ao bloqueio de AR- $\alpha_{1D}$  pelo naftopidil (KOJIMA e cols., 2009), poderiam também estar relacionados aos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, uma vez que este fármaco também é antagonista destes receptores. Sendo assim, podemos destacar as

substâncias LDT3 e LDT5 como potenciais candidatos à fármacos para o tratamento da HPB, uma vez que, além da ação antagonista de AR- $\alpha_1$ , eles apresentam a ação antagonista de receptores 5-HT $_{1A}$ .

Proseguiu-se o estudo verificando se estas substâncias apresentariam atividade anti-proliferativa em células prostáticas humanas. Quando foram adicionados sozinhos, os LDTs não alteraram a morfologia celular, onde pudemos verificar que não houve alteração da orientação dos filamentos de actina do citoesqueleto, por exemplo. Além disso, não se notou alterações no número de núcleos marcados com DAPI, ou nas marcações com ki67.

O antígeno ki67 corresponde a uma proteína nuclear expressa nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular e ausente na fase G0 e em células quiescentes. A presença desta marcação, mesmo com marcações tênues, em todas as imagens demonstram que o tratamento das células com LDT3 e LDT5 não apresentam efeitos sobre a progressão do ciclo celular e não apresentam danos ao DNA, uma vez que este antígeno não é detectável durante processos de reparo de DNA e possui meia-vida curta (sendo degradado em aproximadamente uma hora após a mitose). Sendo assim, podemos verificar que não houve qualquer dano celular.

Além dos dados quantitativos (MTT e contagem de células com exclusão do corante Azul de Trypan), as imagens de microscopia confocal da imunocitoquímica (Fig. 41) nos permitem verificar que a proliferação celular foi induzida pelas vias adrenérgicas (AR- $\alpha_{1D}$ ) e serotoninérgicas (receptores 5-HT $_{1A}$ ). O presente estudo demonstrou um papel dos receptores 5-HT $_{1A}$  e AR- $\alpha_{1D}$  sobre células prostáticas humanas tanto hiperplásicas (provenientes de pacientes portadores de HPB) quanto tumorais (DU-145), estando de acordo com outros dados da literatura (KIM e cols., 2009; DIZEYI e cols., 2011). Este efeito também pode desempenhar um papel importante ao longo do desenvolvimento da HPB contribuindo com aumento prostático por estas vias.

Pode-se observar que LDT3 e LDT5, foram capazes de conter a proliferação induzida por essas duas vias, assim como os antagonistas clássicos desses receptores, BMY7378 (antagonista seletivo AR- $\alpha_{1D}$ ) e *p*-MPPF (antagonista seletivo de receptores 5-HT $_{1A}$ ) corroborando o papel de AR- $\alpha_{1D}$  (KOJIMA e cols., 2009) e receptores 5-HT $_{1A}$  (DIZEYI e cols., 2004,

SIDDIQUI e cols., 2006), na proliferação de células estromais. Notou-se também (Fig. 40A) que a tansulosina promoveu somente uma inibição parcial da proliferação induzida por fenilefrina, quando usada numa concentração (5 nM) aproximadamente 50 vezes maior do que o valor de  $K_i$  relatado na literatura para AR- $\alpha_{1D}$  (CHAGAS-SILVA e cols., 2014). Estes resultados suportam a hipótese de que os LDTs, com destaque para o LDT5, apresentam mais uma vantagem quando comparados à tansulosina, uma vez que apresenta potencial para diminuir ou prevenir o crescimento da próstata em pacientes portadores de HPB.

✓ **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Embora as vias de sinalização mitogênicas canônicas ativadas por GPCRs sejam razoavelmente bem definidas (ROZENGURT, 2007), uma via menos elucidada, mas igualmente importante, da sinalização de GPCRs é a sua capacidade para modular receptores de tirosina-cinases, tais como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (DAUB e cols., 1996). A participação do EGFR na sinalização de GPCR é um processo de transativação crítico para a atividade mitogênica em alguns modelos (DAUB e cols., 1996, PRENZEL e cols., 1999). Esta transativação já foi descrita no trato reprodutor masculino (revisto em AVELLAR e cols., 2009). Um dos mecanismos moleculares propostos para este processo envolve a ativação de um conjunto distinto de metaloproteases e a geração e liberação de determinados membros da família EGF, que por sua vez ativam a EGFR de uma maneira parácrina/autócrina (PRENZEL e cols., 1999; LIEBMANN, 2011) (Fig. 7).

Estudos anteriores indicam que a transativação de EGFRs está envolvida na sinalização de AR- $\alpha_1$ . Por exemplo, a proliferação de células mediada por AR- $\alpha_{1A}$  e contração vascular é dependente da ativação das quinases mediadas por EGFR (OGANESIAN e cols., 2011; ULU e cols., 2010; ZHANG e cols., 2004). A transativação de EGFR por AR- $\alpha_{1B}$  também é bem esclarecida e está envolvida na dessensibilização do receptor (CASAS-GONZALEZ & GARCÍA-SÁINZ, 2006). Em fibroblastos de rato transfectados

com AR- $\alpha_{1D}$  humano, a ativação do EGFR conduz à fosforilação e dessensibilização destes receptores (RODRIGUEZ-PÉREZ e cols., 2009).

O melhor conhecimento sobre o possível papel de AR- $\alpha_{1D}$  no crescimento celular pode contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da HPB e do seu tratamento farmacológico. Para isso, resolvemos prosseguir o estudo investigando a possível transativação de EGFR via receptores AR- $\alpha_{1D}$  em células provenientes de pacientes portadores de HPB. Pode-se notar que a pré-incubação com todos os inibidores da transativação de EGFR mediada por ativação de AR- $\alpha_{1D}$  impediu a proliferação celular induzida por fenilefrina de uma forma semelhante ao observado com o BMY7378 (Fig. 42)

A sinalização mitogênica mediada pela transativação de EGFR por GPCRs envolve as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), originalmente chamadas ERK (cinases reguladas por sinais extracelulares) (ROZENGURT, 1998; JOHNSON & LAPADAT, 2002; MELOCHE & POUYSSEGUR, 2007). Desta forma, avaliamos o envolvimento desta via de sinalização no processo de proliferação celular das células provenientes de pacientes portadores de HPB. Pode-se observar que, corroborando com o observado pelos ensaios de proliferação realizados anteriormente, a fenilefrina foi capaz de induzir uma ativação desta via de sinalização. LDT3 e LDT5 (50 nM) foram capazes de bloquear esse aumento da ativação de ERK (forma fosforilada) induzido pelo tratamento com fenilefrina (100  $\mu$ M) (Fig. 43).

Sendo assim, aprofundar o estudo investigando a influência da via do EGF sobre a proliferação celular em células de pacientes portadores de HPB induzida por agonista  $\alpha_1$  adrenérgico, e investigar as vias de sinalização não canônicas envolvidas na ativação dos AR- $\alpha_{1D}$  e transativação do receptor de EGF e o efeito dos LDTs nesta via, são algumas das etapas subsequentes deste estudo.

*Conclusão*

---

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos LDT3 e LDT5 apresentam, de acordo com modelos teóricos, uma previsão de boa eficiência de ligação aos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e AR- $\alpha$ <sub>1A</sub>.

LDT 3 e LDT5 são antagonistas multialvos com alta afinidade pelos 5-HT<sub>1A</sub>, AR- $\alpha$ <sub>1A</sub> e AR- $\alpha$ <sub>1D</sub>, os quais são relevantes para o tratamento da HPB sintomática. Se destacam por apresentarem menor afinidade por receptores não-alvo da HPB (AR- $\alpha$ <sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, muscarínicos, D<sub>2</sub>-“like”, AR- $\alpha$ <sub>2</sub>, além dos alvos considerados críticos por diversas autoridades reguladoras para a aprovação de novos fármacos). Além disso, não apresentaram toxicidade em ensaios preliminares ou qualquer sinal de citotoxicidade nas células usadas neste estudo.

*In vitro*, as substâncias em estudo inibem a proliferação celular induzida tanto por via adrenérgica (via AR- $\alpha$ <sub>1</sub>) quanto por via serotoninérgica (via receptores 5-HT<sub>1A</sub>) em células provenientes de pacientes portadores de HPB. Inibindo inclusive a ativação da via das MAPK mediada por agonista de AR- $\alpha$ <sub>1</sub>. Estes dados os identificam como candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da HPB.

LDT3 e LDT5 se destacam também por inibirem, *in vitro* e *in vivo*, a contração prostática sem provocar hipotensão arterial significativa.

LDT5, na dose 0,1  $\mu$ g/kg, apresentou uma maior inibição na prevenção do aumento da pressão intra-uretral (PIU) induzida por via adrenérgica quando comparado ao LDT3 na mesma dose ( $P < 0,005$ ), e também se mostrou tão eficaz quanto a tansulosina neste modelo.

Tal conjunto de dados, nos levam a concluir que LDT5 poderia aliviar os LUTS além de reduzir a progressão da doença, uma vez que poderia lentificar o crescimento prostático acentuado característico da HPB.

Este perfil promissor demonstrado pelo LDT5 despertou o interesse da empresa Biozeus Desenvolvimento de Produtos Biofarmacêuticos S.A. culminando no licenciamento de sua patente. Tal acordo, firmado em abril de 2015, possibilita a continuidade do desenvolvimento desse projeto acadêmico viabilizando as demais etapas necessárias à sua continuidade. Essas etapas, apesar de demoradas e de alto custo, são essenciais e podem resultar na aprovação de um novo medicamento, sendo de grande valia, uma vez que

pode promover a melhoria na qualidade de vida dos pacientes portadores de HPB.

*Referências*

---

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.

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

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.

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

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

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

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

AUA guideline on management of benign prostatic hyperplasia. Chapter 1: Diagnosis and treatment recommendations. **J Urol** 170:530-47, 2003.

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

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

AVELLAR, M.C., LÁZARI, M.F., PORTO, C.S. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. **An Acad Bras Cienc.** 81(3):321-344, 2009.

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

BJARNADÓTTIR, T.K., GLORIAM, D.E., HELLSTRAND, S.H., KRISTIANSSON, H., FREDRIKSSON, R., SCHIÖTH, H.B. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. **Genomics** 88: 263–273, 2006.

BOCKAERT, J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, **EMBO J.** 18: 1723–1729, 1999.

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

BOSTANCI, Y., KAZAZI, A., MOMTAHEN, S., LAZE, J., DJAVAN, B. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. **Curr. Opin. Urol.** 23:5–10, 2013.

BOUCHELOUCHE, K., ANDERSEN, L., ALVAREZ, S., NORDLING, J., BOUCHELOUCHE, P. Increased contractile response to phenylephrine in

detrusor of patients with bladder outlet obstruction: effect of the alpha1A and alpha1D-adrenergic receptor antagonist tamsulosin. **J Urol.** 173(2):657-61, 2005.

BOWES, J., BROWN, A.J., HAMON, J., JAROLIMEK, W., SRIDHAR, A., WALDRON, G., WHITEBREAD, S. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. **Nat Rev Drug Discov** 11: 909-922, 2012.

BURDEN, H.P., HOLMES, C.H., PERSAD, R., WHITTINGTON, K. Prostatomes--their effects on human male reproduction and fertility. **Hum Reprod Update.** 12(3):283-92, 2006.

BURNETT, A.L., WEIN, A.J. Benign prostatic hyperplasia in primary care: what you need to know. **J Urol.** 175; S19-24, 2006.

CAINE, M. Alpha-adrenergic blockers for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Urol Clin North Am** 17, 641- 649, 1990.

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

CASAS-GONZÁLEZ, P., GARCÍA-SÁINZ, J.A. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in alpha1B-adrenoceptor phosphorylation. **Eur J Pharmacol.** 542(1-3):31-6, 2006.

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

CHAGAS-SILVA, F.; NASCIMENTO-VIANA, J.B.; ROMEIRO, L.A.S.; et al. 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. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.** 387: 225–234, 2014.

CHEN, Q., TAKASHI, S., ZHONG, S., HOSODA, C., ZHENG, H.Y., OGUSHI, T., FUJIMURA, T., OHTA, N., TANOUE, A., TISUJIMOTO, G., KITAMURA, T. Function of the lower urinary tract in mice lacking alpha-1D-adrenoceptor. **J. Urol.** 174: 370-374, 2005.

CHENG, Y., PRUSOFF, W.H. 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.

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

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

DAUB, H., WEISS, F.U., WALLASCH, C., ULLRICH, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. **Nature.** 379:557-560, 1996.

DE ALMEIDA KIGUTI, L.R., PUPO, A.S. Investigation of the effects of  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonism and L-type calcium channel blockade on ejaculation and vas deferens and seminal vesicle contractility in vitro. **J Sex Med.** 9(1):159-68. 2012

DESIMONE, R. W., CURRIE, K. S., MITCHELL, S. A., DARROW, J. W., PIPPIN, D. A. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 7: (5) 473-493, 2004.

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.

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

DIZEYI, N., HEDLUND, P., BJARTELL, A., TINZL, M., AUSTILD-TASKÉN, K., ABRAHAMSSON, P.A. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. **Urol. Oncol.** 29: 436–445, 2011.

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

DUARTE, C.D., BARREIRO, E.J., FRAGA C.A. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini Rev Med Chem.** 7(11):1108-19, 2007.

EVANS, B.E., RITTLE, K. E., BOCK, M. G., DIPARDO, R. M., FREIDINGER, R. M., WHITTER, W. L., LUNDELL, G. F., VEBER, D. F., ANDERSON, P. S. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. **J. Med. Chem** 31 (12), 2235–2246, 1988.

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.

FAURE, C., PIMOULE, C., VALLANCIEN, G., LANGER, S.Z., GRAHAM, D. Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes present in the human prostate. **Life Sci.** 54(21):1595-605, 1994.

FIORINO, F., PERISSUTTI, E., SEVERINO, B., SANTAGADA, V., CIRILLO, D., TERRACCIANO, S., MASSARELLI, P., BRUNI, G., COLLAVOLI, E., RENNER, C., CALIENDO, G. Nucleus: Synthesis and in Vitro Pharmacological Evaluation. **J. Med. Chem.**, 48: 5495–5503, 2005.

FIORINO, F., SEVERINO, B., MAGLI, E., CIANO, A., CALIENDO, G., SANTAGADA, V., FRECENTESE, F., PERISSUTTI, E. 5-HT<sub>1A</sub> receptor: an old target as a new attractive tool in drug discovery from central nervous system to câncer. **J Med Chem** 57: 4407-4426, 2014.

FORD, A.P., DANIELS, D.V., CHANG, D.J., GEVER, J.R., JASPER, J.R., LESNICK, J.D., CLARKE, D.E. Pharmacological pleiotropism of the human recombinant alpha1A-adrenoceptor: implications for alpha1-adrenoceptor classification. **Br. J. Pharmacol.** 121(6):1127-35, 1997.

FORRAY, C., BARD, J.A., WETZEL, J.M., CHIU, G., SHAPIRO, E., TANG, R., LEPOR, H., HARTIG, P.R., WEINSHANK, R.L., BRANCHEK, T.A., The alpha 1-adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human alpha 1c subtype. **Mol. Pharmacol.** 45(4):703-8, 1994.

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.

GANDELLINI, P., PROFUMO, V., CASAMICHELE, A., FENDERICO N, BORRELLI S, PETROVICH G, SANTILLI G, CALLARI M, COLECCHIA M, POZZI S, DE CESARE M, FOLINI M, VALDAGNI R, MANTOVANI R, ZAFFARONI N., miR-205 regulates basement membrane deposition in human prostate : implications for cancer development. **Cell Death Differ.** 19: 1750–1760, 2012.

GARCIA-SAINZ, J.A.; VAZQUEZ-PRADO, J., VILLALOBOS-MOLINA, R. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. **Arch. Med. Res.** 30 (6): 449-58, 1999.

GENTILI, C., MORELLI, S., RUSSO DE BOLAND, A. Involvement of PI3-kinase and its association with c-Src in PTH-stimulated rat enterocytes. **J. Cell Biochem.** 86 (4): 773–83, 2002.

GEORGE, S.R., O'DOWD, B.F., LEE, S.P. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.** 1 (10): 808 – 20, 2002.

GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. **J. Combin. Chem.** 1: 55-68,1999.

GIULIANO, F.A., CLÉMENT, P., DENYS, P., ALEXANDRE, L., BERNABÉ, J. Comparison between tamsulosin and alfuzosin on the expulsion phase of ejaculation in rats. **BJU Int.** 98:876-879, 2006.

GIULIANO, F. Impact of medical treatments for benign prostatic hyperplasia on sexual function. **BJU Int.** 97 (Suppl 2): 34-8 - discussion 44-5, 2006.

GIULIANO, F. Medical treatments for benign prostatic hyperplasia and sexual function. **BJU Int.**102: 8-12, 2008.

GLENNON, R.A. Concepts for the design of 5-HT<sub>1A</sub> serotonin agonists and antagonists.**Drug Dev. Res.** 26: 251–274, 1993.

GROVES, H.K., CHANG, D., PALAZZI, K., COHEN, S., PARSONS, J.K. The incidence of acute urinary retention secondary to BPH is increasing among California men. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** 16(3):260-5, 2013.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. **J Biol Chem** 260: 3440-3450, 1985.

GUDERMANN, T., SCHÖNEBERG, T., SCHULTZ, G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. **Annu. Rev. Neurosci.** 20: 399-427, 1997.

HADDAD, S., RESTIERI, C., KRISHNAN, K. Characterization of age-related changes in body weight and organ weights from birth to adolescence in humans. **J Toxicol Environ Health** 64:453–464, 2001.

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

HAMDI, A ; ONAIVI, ES ; PRASAD, C. A low protein-high carbohydrate diet decreases D2 dopamine receptor density in rat brain. **Life Sci.** 50: 1529–1534, 1992.

HANDY, D.E., FLORDELLIS, C.S., BOGDANOVA, N.N., BRESNAHAN, M.R., GAVRAS, H. Diverse tissue expression of rat alpha 2-adrenergic receptor genes. **Hypertension.** 6:861-5, 1993.

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

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

HATANO, A., TAKAHASHI, H., TAMAKI, M., KOMEYAMA, T., KOIZUMI, T., TAKEDA, M. Pharmacological evidence of distinct alpha 1-adrenoceptor

subtypes mediating the contraction of human prostatic urethra and peripheral artery. **Br. J. Pharmacol.** 113(3):723-8, 1994.

HEIN, L., ALTMAN, J.D., KOBILKA, B.K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. **Nature** 402: 181–184, 1999.

HENNENBERG, M., STIEF, C.G., GRATZKE, C. Prostatic  $\alpha$ 1-Adrenoceptors: New Concepts of Function , Regulation , and Intracellular Signaling. **Neurourol. Urodyn.** 33(7):1074-85,2013.

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

HIBERT, M.F., TRUMPP-KALLMEYER, S., BRUINVELS, A., HOFLACK, J. Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. **Mol Pharmacol.** 40(1):8-15, 1991.

HIEBLE, J.P., BYLUND, D.B., CLARKE, D.E., EIKENBUR, D.C., LANGER, S.Z., LEFKOWITZ, R.J., MINNEMAN, K.P., RUFFOLO, R.R. International Union of Pharmacology. X. Recommendations for Nomenclature of Alpha<sub>1</sub>-Adrenoceptors: Consensus Update. **Pharmacol. Rev.** 45: 267-270, 1995.

HIEBLE, J.P., RUFFOLO, R.R.J.R. Recent advances in the identification of alpha1- and alpha2-adrenoceptor subtypes: therapeutic implications. **Expert Opin Investig Drugs.** 6(4):367-87, 1997.

HIEBLE, J.P. ANIMAL MODELS FOR BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA. **HANDB. EXP. PHARMACOL.** 202:69–79, 2011.

HIRAOKA, Y., OHMURA, T., OSHITA, M., WATANABE, Y., MORIKAWA, K., NAGATA, O., KATO, H., TANIGUCHI, T., MURAMATSU, I. Binding and functional characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat prostate. **Eur. J. Pharmacol.** 366 (1): 119–126, 1999.

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

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

HUBER, T., MENON, S., SAKMAR, T.P. Structural basis for ligand binding and specificity in adrenergic receptors: implications for GPCR-targeted drug discovery. **Biochemistry.** 47(42):11013-23, 2008.

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

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

ITO, K., OHTANI, H., SAWADA, Y. Assessment of alpha1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia based on the receptor occupancy theory. **Br J Clin Pharmacol.** 63(4):394-403, 2006

JELSKI, J., SPEAKMAN, M. Alpha adrenoreceptor antagonists - have we reached the optimum balance of safety / efficacy? **Drug Disc Today: Ther Strategies** 9:e27–e33, 2012.

JOHNSON, G.L., LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science.** 298(5600):1911-1912, 2002.

KALTENBACH, J.P., KALTENBACH M.H., LYONS, W.B. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. **Exp Cell Res.** 15(1):112-7, 1958.

KARNIK, S.S., GOGONEA, C., PATIL, S., SAAD, Y., TAKEZAKO, T. Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. **Trends Endocrinol Metab.** 14(9):431-7, 2003.

KENAKIN, T. **Competitive antagonism, in pharmacologic analysis of drug-receptor interaction.** 2º ed. Raven press, Nova York. pp: 278-322, 1993.

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

KIM, J., YANAGIHARA, Y., KIKUGAWA, T., JI, M., TANJI, N., MASAYOSHI, Y., FREEMAN, M.R. A signaling network in phenylephrine-induced benign prostatic hyperplasia. **Endocrinology** 150:3576–3583, 2009.

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

KONTANI, H.; TSUJI, T.; KIMURA, S. Effects of adrenergic  $\alpha_2$ -receptor agonists on urinary bladder contraction in conscious rats. **Jpn. J. Pharmacol.** 84: 381–390, 2000.

KOJIMA, Y., SASAKI, S., ODA, N., KOSHIMIZU, T.A., HAYASHI, Y., KINIWA, M., TSUJIMOTO, G., KOHRI, K. Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha(1)-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. **Prostate.** 69(14):1521-8., 2009

KOJIMA, Y., SASAKI, S., SHINOURA, H., TSUJIMOTO, 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.

KUBINYI, H. Strategies and recent technologies in the drug discovery. **Pharmazie** 50;647-62, 1995.

KUBO, H., HAZEKI, K., TAKASUGA, S., HAZEKI, O. Specific role for p85/p110beta in GTP-binding-protein-mediated activation of AKT. **Biochem. J.** 392 (3): 607–14, 2005.

KUNG, H.F.; STEVENSON, D.A.; ZHUANG, Z.P.; et al. New 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist: [3H]p-MPPF. **Synapse** 23: 344–346, 1996.

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

LAHTI, R.A., FIGUR, L.M., PIERCEY, M.F., RUPPEL, P.L., EVANS, D.L. Intrinsic activity determinations at the dopamine D<sub>2</sub> guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor: utilization of receptor state binding affinities. **Mol. Pharmacol.** 42:432–438, 1992.

LANDER, E.S., LINTON, L.M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M.C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J.P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGETHOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J.C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M.,

SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R.H., WILSON, R.K., E., L.W., HILLIER, L.W., MC PHERSON, J.D., MARRA, M.A., MARDIS, E.R., FULTON, L.A., CHINWALLA, A.T., PEPIN, K.H., GISH, W.R., CHISSOE, S.L., WENDL, M.C., DELEHAUNTY, K.D., MINER, T.L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J.B., COOK, L.L., FULTON, R.S., JOHNSON, D.L., MINX, P.J., CLIFTON, S.W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J.F., OLSEN, A., LUCAS, S., UBERBACHER, E., Frazier, M. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** 409, 860–921, 2001

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

LEONARDI, A., HIEBLE, J.P., GUARNERI, L., NASELSKY, D.P., POGGESI, E., SIRONI, G., SULPIZIO, A.C., TESTA, R. Pharmacological Characterization of the Uroselective Alpha -1 Antagonist Rec 15 / 2739 ( SB 216469 ): Role of the Alpha -1L Adrenoceptor in Tissue Selectivity , Part I. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 281 (3): 1272–1283, 1997.

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

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

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

LEPOR, H., WILLIFORD, W.O., BARRY, M.J., BRAWER, M.K., DIXON, C.M., GORMLEY, G., HAAKENSON, C., MACHI, M., NARAYAN, P., PADLEY, R.J. The efficacy of terazosin, finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study Group. **N Engl J Med.** 335(8):533-9. 1996

LIEBMANN, C. EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions. **Mol Cell Endocrinol.** 331(2):222-231, 2011.

LINDSAY, M.A. Target discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 2, 831–838, 2003

LIPINSKI, C.A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies** (1):337-341, 2004.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development settings. **Adv. Drug Delivery Rev**, (23):.3-25, 1997.

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

LÓPEZ-RODRIGUEZ, M.L., AYALA, D., BENHAMU, B., MORCILLO, M.J., VISO, A. Arylpiperazine derivatives acting at 5-HT(1A) receptors. **Curr Med Chem** 9:443-69, 2002.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.L., VICENTE, B., DEUPI, X., BARRONDO, S., OLIVELLA, M., MORCILLO, M.J., BEHAMÚ, B., BALLESTEROS, J.A., SALLÉS, J., PARDO, L. Design, synthesis and pharmacological evaluation of 5-hydroxytryptamine(1a) receptor ligands to explore the three-dimensional structure of the receptor. **Mol Pharmacol.** Jul;62(1):15-21, 2002.

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

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193(1):265-75, 1951.

LU, J.J., PAN W., HU Y.J., WANG Y.T. Multi-Target Drugs: The Trend of Drug Research and Development. **PLoS ONE** 7(6): e40262. doi:10.1371, 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.

MCCONNELL, J.D., ROEHRBORN, C.G., BAUTISTA, O.M., ANDRIOLE, G.L. Jr, DIXON, C.M., KUSEK, J.W., LEPOR, H., MCVARY, K.T., NYBERG, L.M. Jr, CLARKE, H.S., CRAWFORD, E.D., DIOKNO, A., FOLEY, J.P., FOSTER, H.E., JACOBS, S.C., KAPLAN, S.A., KREDER, K.J., LIEBER, M.M., LUCIA, M.S., MILLER, G.J., MENON, M., MILAM, D.F., RAMSDELL, J.W., SCHENKMAN, N.S., SLAWIN, K.M., SMITH, J.A. Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Research Group. The long-term effects of doxazosin, finasteride and the combination on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. **N. Engl. J. Med.** 349: 2387–2398, 2003.

MCVARY, K.T., ROEHRBORN, C.G., AVINS, A.L., BARRY, M.J., BRUSKEWITZ, R.C., DONNELL, R.F., FOSTER, H.E. Jr, GONZALEZ, 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.

MAIA, R.C., TESCH, R., FRAGA, C.A. Phenylpiperazine derivatives: a patent review (2006 - present). **Expert Opin Ther Pat.** (10):1169-78, 2012.

MALLOY, B.J., PRICE, D.T., PRICE, R.R., BIENSTOCK, A.M., DOLE, M.K., FUNK, B.L., RUDNER, X.L., RICHARDSON, C.D., DONATUCCI, C.F.,

SCHWINN, D.A. Alpha1-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. **J. Urol.** Sep;160(3 Pt 1):937-43, 1998.

MARBERGER, M., FREEDLAND, S.J., ANDRIOLE, G.L., EMBERTON, M., PETTAWAY, C., MONTORSI, F., TELOKEN, C., RITTMASER, R.S., SOMERVILLE, M.C., CASTRO, R. Usefulness of prostate-specific antigen (PSA) rise as a marker of prostate cancer in men treated with dutasteride: lessons from the REDUCE study. **BJU Int.** 109(8):1162-9, 2012.

MARINISSEN, M.J., GUTKIND, S. G-Protein Coupled Receptors And Signaling Networks: Emerging Paradigms. **Trends Pharmacol. Sci.** 22: 368-376, 2001.

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

MARSHALL, I., BURT, R.P., CHAPPLE, C.R., Noradrenaline contractions of human prostate mediated by alpha 1A-(alpha 1c-) adrenoceptor subtype. **Br. J. Pharmacol.** 115(5):781-6, 1995.

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

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

MCNEAL, J.E. Regional morphology and pathology of the prostate. **Am J Clin Pathol.** 49(3):347-57, 1968.

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

MELOCHE, S., POUYSSEGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene** 26:3227–3239, 2007.

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.** 112: 151–157, 2010.

MICHEL, M.C., GOEPEL, M. Differential alpha1-adrenoceptor labeling by [3H]prazosin and [3H]tamsulosin. **Eur J Pharmacol.** 19;342(1):85-92, 1998.

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

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

MURAMATSU, I., OSHITA, M., OHMURA, T., KIGOSHI, S., AKINO, H., GOBARA, M., OKADA, K. Pharmacological characterization of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor subtypes in the human prostate: functional and binding studies. **Br. J. Urol.** 74(5):572-8, 1994.

MYERS, R.P, CHEVILLE, J.C., PAWLINA, W. Making anatomic terminology of the prostate and contiguous structures clinically useful: historical review and suggestions for revision in the 21st century. **Clin Anat** 23:18–29, 2010.

NANDA, K., NARUGANAHALLI, K.S., GUPTA, S., MALHOTRA, S., TIWARI, A., HEGDE, L.G., JAIN, S., SINHA, N., GUPTA, J.B., CHUGH, A., ANAND, N., RAY, A. RBx 6198: a novel alpha1-adrenoceptor antagonist for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Eur. J. Pharmacol.** 607: 213–219, 2009.

NASCIMENTO, J.B., **Avaliação farmacológica de novos antagonistas duais de adrenoceptores- $\alpha_1$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>: características estruturais de derivados N-fenilpiperazínicos que influenciam o parâmetro afinidade.** 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

NASU, K., MORIYAMA, N., KAWABE, K., TSUJIMOTO, G., MURAI, M., TANAKA, T., YANO, J., NELSON, D.L., LUCAITES, V.L., AUDIA, J.E., NISSEN, J.S., WAINSCOTT, D.B. Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. **Br. J. Pharmacol.** 119: 797–803, 1996.

NELSON, E.C., CAMBIO, A.J., YANG, J.C., OK, J.H., LARA, P.N. Jr, EVANS, C.P. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** 10(1):6-14, 2007.

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 D<sub>2</sub>-like and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Bioorg. Med. Chem.** 18(5):1925-35, 2010.

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

NICKEL, J.C. Benign Prostatic Hyperplasia: Does Prostate Size Matter? **Rev Urol** 5: S12-S17, 2003.

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

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

NISHINO, Y., MASUE, T., MIWA, K., TAKAHASHI, Y., ISHIHARA, S., DEGUCHI, T. Comparison of two alpha1-adrenoceptor antagonists, naftopidil and tamsulosin hydrochloride, in the treatment of lower urinary tract symptoms with benign prostatic hyperplasia: a randomized crossover study. **BJU. Int.** 97: 747–51, 2006.

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

NOËL, 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. Methods** 70 (1): 12-18, 2014.

OELKE, M.; BACHMANN, A.; DESCAZEAUD, A.; EMBERTON, M., GRAVAS, S., MICHEL, M.C., N'DOW, J., NORDLING, J., DE LA ROSETTE, J.J., European Association of Urology. EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. **Eur. Urol.** 64: 118–140, 2013.

OGANESIAN, A., YAROV-YAROVYOY, V., PARKS, W.C., SCHWINN, D.A. Constitutive coupling of a naturally occurring human alpha1a-adrenergic receptor genetic variant to EGFR transactivation pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 108(49):19796-19801, 2011.

OLDHAM, W.M., HAMM, E. Heterotrimeric G Protein Activation By G-Protein-Coupled Receptors. **Nature** 9: 60-71, 2008.

OLIVARES-REYES, J.A., SHAH, B.H., HERNÁNDEZ-ARANDA, J., GARCÍA-CABALLERO, A., FARSHORI, M.P., GARCÍA-SÁINZ, J.A., CATT, K.J. Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors. **Mol Pharmacol.** 68(2):356-64, 2005.

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

O’SULLIVAN, M., MURPHY, C., DEASY, C., IOHOM, G., KIELY, E.A., SHORTEN, G. Effects of transurethral resection of prostate on the quality of life of patients with benign prostatic hyperplasia. **J Am Coll Surg** 198:394-403, 2004.

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

PERABO, F.G.E. Drug development for LUTS – the challenge for industry. **Drug Disc Today: Ther Strategies** 9:e5–e14, 2012.

PEROUTKA, S.J. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>1C</sub> binding sites in rat frontal cortex. **J. Neurochem.** 47 529-540, 1986.

PETERS, J.U. Polypharmacology - foe or friend? **J Med Chem** 56: 8955-8971, 2013.

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

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

PRADIDARCHEEP, W., WALLNER, C., DABHOIWALA, N.F., LAMERS W.H. Anatomy and Histology of the Lower Urinary Tract **Handbook of Experimental Pharmacology** 202:117-148, 2011.

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

PRENZEL, N., ZWICK, E., DAUB, H., LESERER, M., ABRAHAM, R., WALLASCH, C., ULLRICH, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. **Nature.** 402:884-888, 1999.

PRICE, D.T., SCHWINN, D.A., LOMASNEY, J.W., ALLEN, L.F., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. Identification, quantification and localization of mRNA for three distinct  $\alpha_1$  adrenergic receptor subtypes in human prostate. **J. Urol.** 150: 546–551, 1993.

PRIEST, B., BELL, I.M., GARCIA, M. Role of hERG potassium channel assays in drug development. **Channels** 2: 97-93, 2008.

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

PULITO, V.L., LI, X., VARGA, S.S., MULCAHY, L.S., CLARK, K.S., HALBERT, S.A., REITZ, A.B., MURRAY, W.V., JOLLIFFE, L.K. An investigation of the uroselective properties of four novel  $\alpha(1a)$ -adrenergic receptor subtype-selective antagonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 294: 224–229, 2000.

RICHARDSON, C.D., DONATUCCI, C.F., PAGE, S.O., WILSON, K.H., SCHWINN, D.A. Pharmacology of tamsulosin: saturation-binding isotherms and competition analysis using cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. **Prostate**. 15;33(1):55-9, 1997.

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

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.E., CALVO-OCHOA, E., KALASHNIKOVA, E.V., REYES-CRUZ, G., ROMERO-AVILA, M.T., GARCÍA-SÁINZ, J.A. Receptor tyrosine kinases regulate alpha1D-adrenoceptor signaling properties: phosphorylation and desensitization. *Int J Biochem Cell Biol*. 6:1276-1283, 2009.

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(3):937-49, 1989.

ROEHRBORN, C.G. Reducing the risk of benign prostatic hyperplasia progression. **Rev Urol**. 4:29-38, 2002.

ROEHRBORN, C.G. Clinical management of lower urinary tract symptoms with combined medical therapy. **BJU Int**. 2:13-7. 2008.

ROEHRBORN, C.G.. Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). **Med. Clin. North Am**. 95: 87–100. 2011.

ROKOSH, D.G., STEWART, A.F., CHANG, K.C., BAILEY, B.A., KARLINER, J.S., CAMACHO, S.A., LONG, C.S., SIMPSON, P.C. Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. **J. Biol. Chem**.271: 5839–43, 1996.

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., TIBIRIÇÁ, 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.

ROSINI, M., BOLOGNESI, M.L., GIARDINA, D. MINARINI, A., TUMIATTI, V., MELCHIORRE, C. Recent advances in alpha1-adrenoreceptor antagonists as pharmacological tools and therapeutic agents. **Curr Top Med Chem** 7:147-62, 2007.

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

ROZENGURT, E Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. **J Cell Physiol.** 213(3):589-602, 2007.

ROZENGURT, E. Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. **J Cell Physiol** 177:507–517, 1998.

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.

RYBULKIN, S.D., YAN, C., BORNFELD, K.E., BEAVO, J.A. Cyclic GMP phosphodiesterase and smooth muscle function. **Circ Res** 93: 280–91, 2003.

SAMPSON, N., UNTERGASSER, G., PLAS, E., BERGER, P. The ageing male reproductive tract. **J Pathol** 211:206–218, 2007.

SATO, S., HATANAKA, T., YUYAMA, H., UKAI, M., NOGUCHI, Y., OHTAKE, A., TAGUCHI, K., SASAMATA, M., MIYATA, K. Tamsulosin potently and selectively antagonizes human recombinant  $\alpha(1A/1D)$ -adrenoceptors: slow dissociation from the  $\alpha(1A)$ -adrenoceptor may account for selectivity for  $\alpha(1A)$ -adrenoceptor over  $\alpha(1B)$ -adrenoceptor subtype. **Biol Pharm Bull.** 35(1):72-7, 2012.

SCHAUER, I., MADERSBACHER, S. Medical treatment of lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia: anything new in 2015. **Curr Opin Urol.** 25(1):6-11, 2015

SCHIÖTH, H.B., FREDRIKSSON, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. **Gen. Comp. Endocrinol.** 142 (1-2): 94-101, 2005.

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

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

SCIARRA, A., MARIOTTI, G., SALCICCIA, S., AUTRAN GOMEZ, A., MONTI, S., TOSCANO, V., DI SILVERIO, F. Prostate growth and inflammation. **J Steroid Biochem Mol Biol** 108: 254-260, 2008.

SCOFIELD, M.A., LIU, F., ABEL, P.W., JEFFRIES, W.B. Quantification of the steady state expression of mRNA for alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 275: 1035-1042, 1995.

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

SIDDIQUI, E.J., SHABBIR, M., MIKHAILIDIS, D.P., THOMPSON, C.S., MUMTAZ, F.H. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. **J Urol.** 176;1648-53, 2006.

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

SOMLYO, A.P.; AND SOMLYO, A. V. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol. Rev.** 83: 1325–1358, 2003.

SOSKIC, V., JOKSIMOVIC, J. Bioisosteric approach in the design of new dopaminergic/serotonergic ligands. **Curr Med Chem** 5:493-512, 1998.

SOUZA, P.A.V.R., PALUMBO, A., ALVES, L.M., DE SOUZA, V.P., CABRAL, L.M., FERNANDES, P.D., TAKIYA, C.M., MENEZES, F.S., NASCIUTTI, L.E. Effects of a nanocomposite containing *Orbignya speciosa* lipophilic extract on Benign Prostatic Hyperplasia. **J. Ethnopharmacol.** 135: 135–146, 2011.

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

TAKE, H., SHIBATA, K., AWAJI, T., HIRASAWA, A., IKEGAKI, I., ASANO, T., TAKADA, T., TSUJIMOTO, G. Vascular  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtype selectivity and  $\alpha$ 1-blocker-induced orthostatic hypotension. **Jpn. J. Pharmacol.** 77: 61–70, 1998.

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

TESTA, R., GUARNERI, L., IBBA, M., STRADA, G., POGGESI, E., TADDEI, C., SIMONAZZI, I., LEONARDI, A.. Characterization of alpha 1- adrenoceptor subtypes in prostate and prostatic urethra of rat, rabbit, dog and man. **Eur. J. Pharmacol.** 249: 307–315, 1993.

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

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

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

TSENG-CRANK, J., KOST, T., GOETZ, A., HAZUM, S., ROBERSON, K.M., HAZLIP, J., GODINOT, N., ROBERTSON, C.N., SAUSSY, D. The  $\alpha_{1C}$ -adrenoceptor in human prostate: Cloning, functional expression, and localization to specific prostatic cell types. **Br. J. Pharmacol.** 115: 1475–1485, 1995.

ÜCKERT, S. & OELKE, M. Phosphodiesterase (PDE) inhibitors in the treatment of lower urinary tract dysfunction. **Br J Clin Pharmacol.** 72(2): 197–204, 2011.

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

ULU, N., GURDAL, H., LANDHEER, S.W., DUIN, M., GUC, M.O., BUIKEMA, H., HENNING, R.H.  $\alpha$ 1-Adrenoceptor-mediated contraction of rat aorta is partly mediated via transactivation of the epidermal growth factor receptor. **Br J Pharmacol.** 161(6):1301-1310, 2010.

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

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL<sub>50</sub>”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3 (2), 93-98, 2006.

VÁZQUEZ-PRADO, J., MEDINA, L.C., GARCÍA-SÁINZ, J.A. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. **J Biol Chem** 272: 27330-27337, 1997.

VENTER, J. C., ADAMS, M.D., MYERS, E.W., LI, P.W., MURAL, R.J., SUTTON, G.G., SMITH, H.O., YANDELL, M., EVANS, C.A., HOLT, R.A., GOCAYNE, J.D., AMANATIDES, P., BALLEW, R.M., HUSON, D.H., WORTMAN, J.R., ZHANG, Q., KODIRA, C.D., ZHENG, X.H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P.D., ZHANG, J., GABORMIKLOS, G.L., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A.G., NADEAU, J., MCKUSICK, V.A., ZINDER, N., LEVINE, A.J., ROBERTS, R.J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L., HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K., ABU-THREIDEH, J., BEASLEY, E., BIDDICK, K., BONAZZI, V., BRANDON, R., CARGILL, M., CHANDRAMOULISWARAN, I., CHARLAB, R., CHATURVEDI, K., DENG, Z., DI FRANCESCO, V., DUNN, P., EILBECK, K., EVANGELISTA, C., GABRIELIAN, A.E., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T.J., HIGGINS, M.E., JI, R.R., KE, Z., KETCHUM, K.A., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G.V., MILSHINA, N.,

MOORE, H.M., NAIK, A.K., NARAYAN, V.A., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D.B., SALZBERG, S., SHAO, W., SHUE, B., SUN, J., WANG, Z., WANG, A., WANG, X., WANG, J., WEI, M., WIDES, R., XIAO, C., YAN, C., YAO, A., YE, J., ZHAN, M., ZHANG, W., ZHANG, H., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHONG, F., ZHONG, W., ZHU, S., ZHAO, S., GILBERT, D., BAUMHUETER, S., SPIER, G., CARTER, C., CRAVCHIK, A., WOODAGE, T., ALI, F., AN, H., AWE, A., BALDWIN, D., BADEN, H., BARNSTEAD, M., BARROW, I., BEESON, K., BUSAM, D., CARVER, A., CENTER, A., CHENG, M.L., CURRY, L., DANAHER, S., DAVENPORT, L., DESILETS, R., DIETZ, S., DODSON, K., DOUP, L., FERRIERA, S., GARG, N., GLUECKSMANN, A., HART, B., HAYNES, J., HAYNES, C., HEINER, C., HLADUN, S., HOSTIN, D., HOUCK, J., HOWLAND, T., IBEGWAM, C., JOHNSON, J., KALUSH, F., KLINE, L., KODURU, S., LOVE, A., MANN, F., MAY, D., MCCAWLEY, S., MCINTOSH, T., MCMULLEN, I., MOY, M., MOY, L., MURPHY, B., NELSON, K., PFANNKOCH, C., PRATTS, E., PURI, V., QURESHI, H., REARDON, M., RODRIGUEZ, R., ROGERS, Y.H., ROMBLAD, D., RUHFEL, B., SCOTT, R., SITTER, C., SMALLWOOD, M., STEWART, E., STRONG, R., SUH, E., THOMAS, R., TINT, N.N., TSE, S., VECH, C., WANG, G., WETTER, J., WILLIAMS, S., WILLIAMS, M., WINDSOR, S., WINN-DEEN, E., WOLFE, K., ZAVERI, J., ZAVERI, K., ABRIL, J.F., GUIGÓ, R., CAMPBELL, M.J., SJOLANDER, K.V., KARLAK, B., KEJARIWAL, A., MI, H., LAZAREVA, B., HATTON, T., NARECHANIA, A., DIEMER, K., MURUGANUJAN, A., GUO, N., SATO, S., BAFNA, V., ISTRAIL, S., LIPPERT, R., SCHWARTZ, R., WALENZ, B., YOOSEPH, S., ALLEN, D., BASU, A., BAXENDALE, J., BLICK, L., CAMINHA, M., CARNES-STINE, J., CAULK, P., CHIANG, Y.H., COYNE, M., DAHLKE, C., MAYS, A., DOMBROSKI, M., DONNELLY, M., ELY, D., ESPARHAM, S., FOSLER, C., GIRE, H., GLANOWSKI, S., GLASSER, K., GLODEK, A., GOROKHOV, M., GRAHAM, K., GROPMAN, B., HARRIS, M., HEIL, J., HENDERSON, S., HOOVER, J., JENNINGS, D., JORDAN, C., JORDAN, J., KASHA, J., KAGAN, L., KRAFT, C., LEVITSKY, A., LEWIS, M., LIU, X., LOPEZ, J., MA, D., MAJOROS, W., MCDANIEL, J., MURPHY, S., NEWMAN, M., NGUYEN, T., NGUYEN, N., NODELL, M., PAN, S., PECK, J., PETERSON, M., ROWE, W., SANDERS, R., SCOTT, J., SIMPSON, M., SMITH, T., SPRAGUE, A.,

STOCKWELL, T., TURNER, R., VENTER, E., WANG, M., WEN, M., WU, D., WU, M., XIA, A., ZANDIEH, A., ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science** 291:1304-1351, 2001

VENTURA, S., OLIVER, V.L., WHITE, C.W., XIE, J.H., HAYNES, J.M., EXINTARIS, B. Novel drug targets for the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Br. J. Pharmacol** 163: 891–907, 2011.

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: 205–17, 2011.

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

WALDEN, P.D., DURKIN, M.M., LEPOR, H., WETZEL, J.M., GLUCHOWSKI, C., GUSTAFSON, E.L. Localization of mRNA and receptor binding sites for the alpha 1a-adrenoceptor subtype in the rat, monkey and human urinary bladder and prostate. **J Urol.** 157(3):1032-8, 1997.

WALDEN, P.D., GERARDI, C., LEPOR, H. Localization and expression of the alpha1A-1, alpha1B and alpha1D-adrenoceptors in hyperplastic and non-hyperplastic human prostate. **J Urol.** 161(2):635-40, 1999.

WELL, D., YANG, H., HOUSENI, M., IRUVURI, S., ALZEAIR, S., SANSOVINI, M., WINTERING, N., ALAVI, A., TORIGIAN, D.A. Age-related structural and metabolic changes in the pelvic reproductive end organs. **Semin Nucl Med.** 37(3):173-84, 2007.

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

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

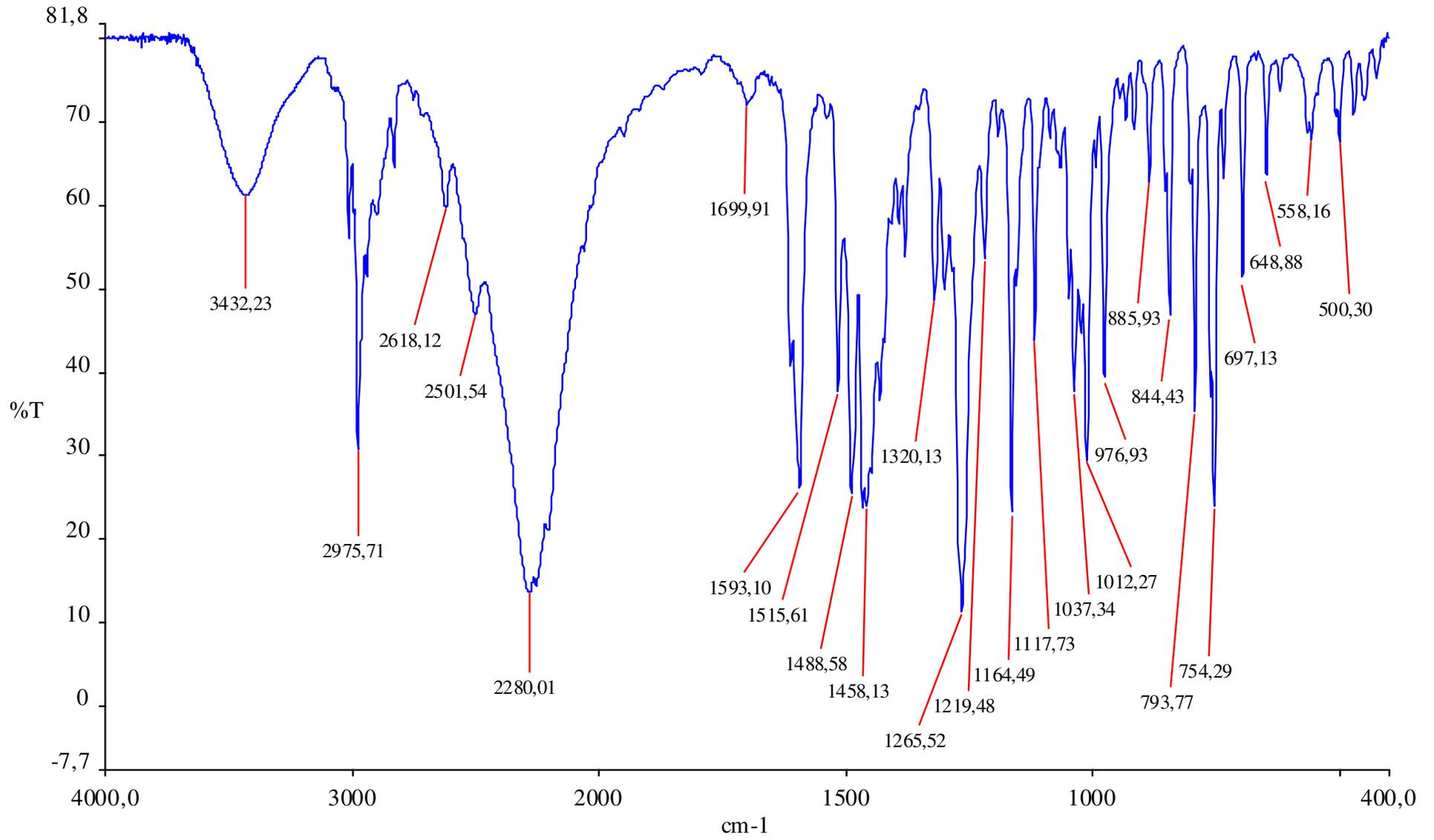
ZAKARIA, L., ANASTASIADIS, A.G., SHABSIGH, R. Common conditions of the aging male: erectile dysfunction, benign prostatic hyperplasia, cardiovascular disease and depression. **Int Urol Nephrol.**;33(2):283-92, 2001.

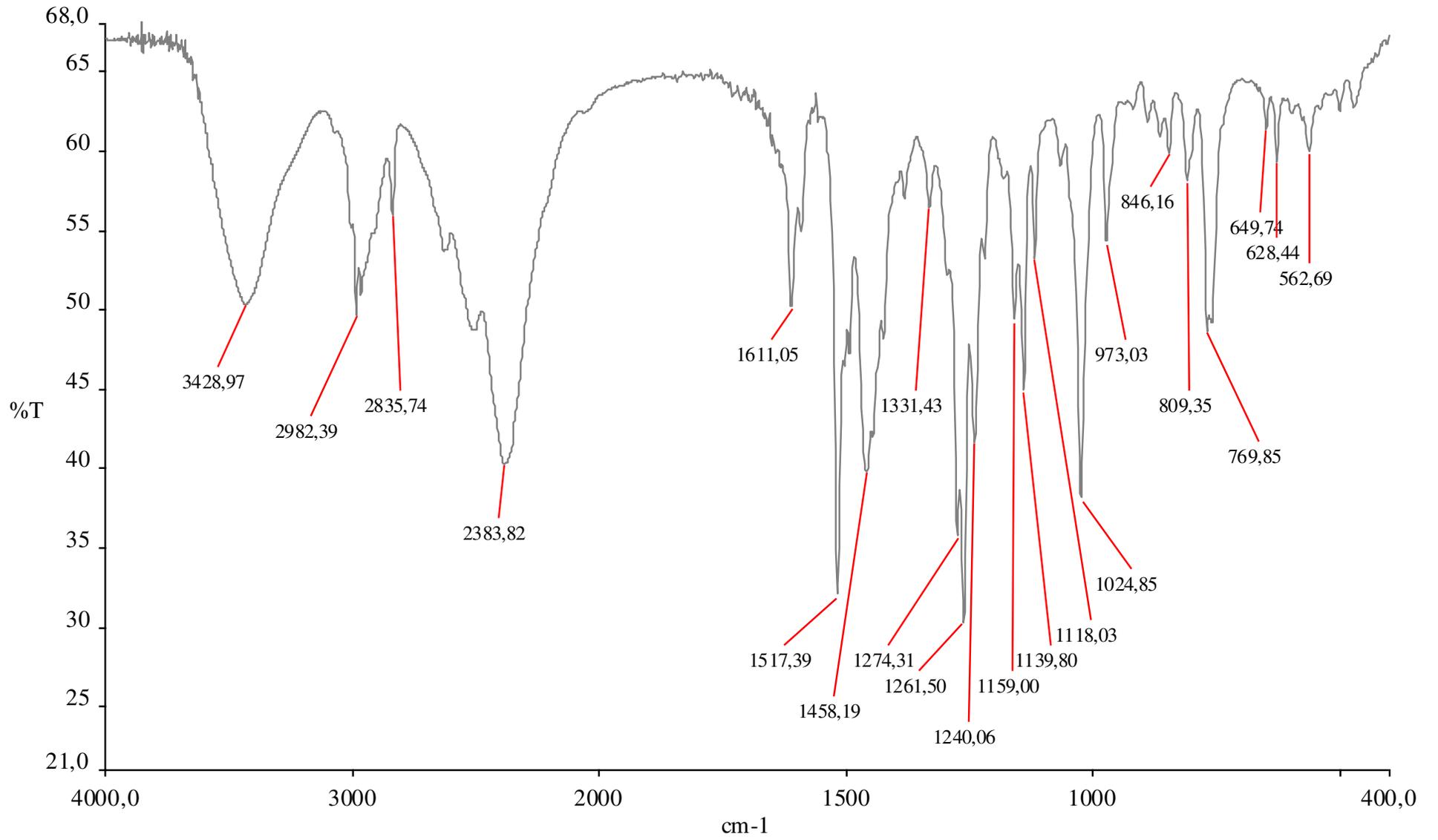
ZHANG, H., CHALOTHORN, D., JACKSON, L.F., LEE, D.C., FABER, J.E. Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle. **Circ Res.** 10: 989-997, 2004.

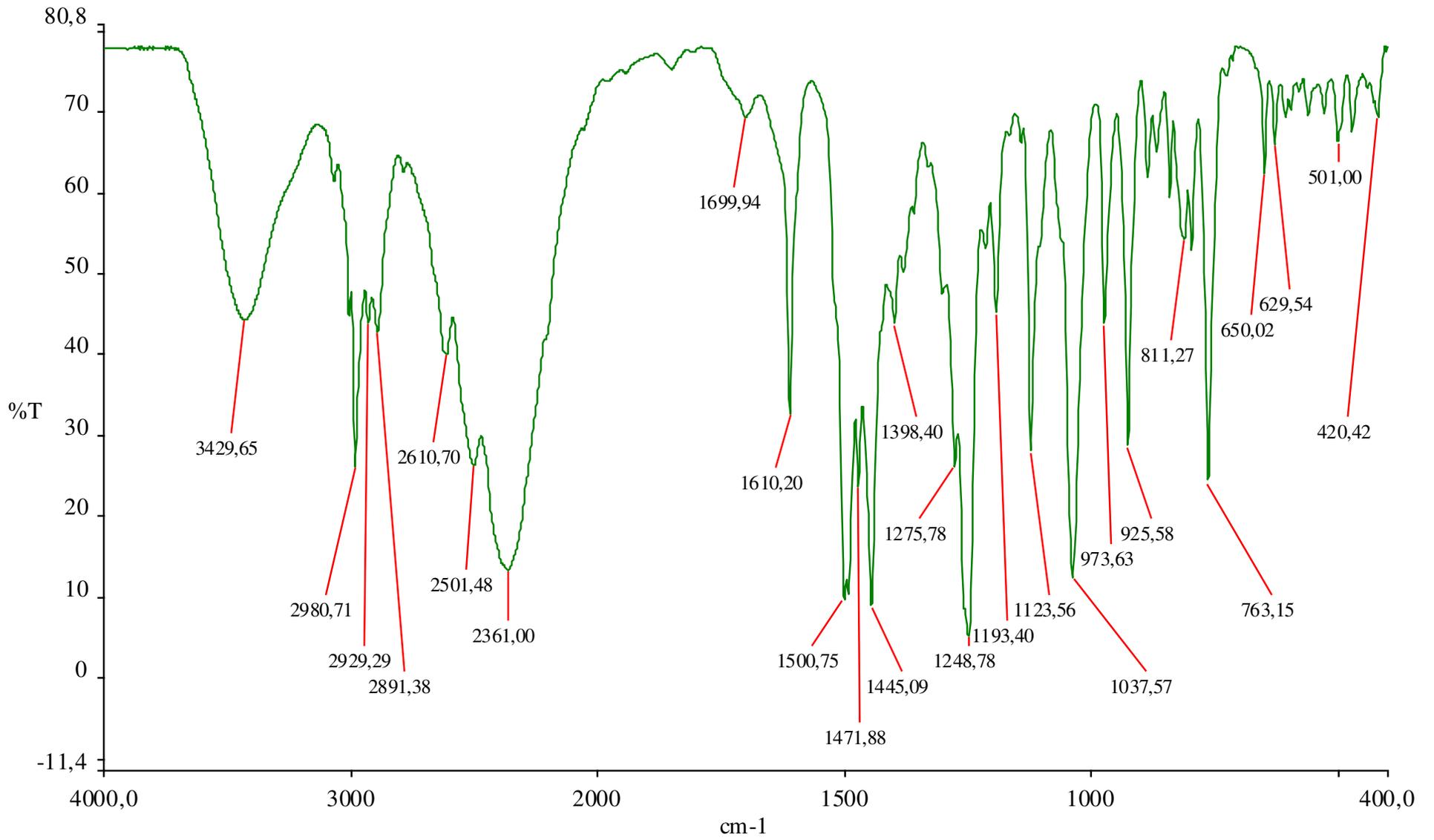
ZHONG, H., MINNEMAN, K.P.  $\alpha_1$ -adrenoceptors subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** 375: 261-276, 1999.



# ESPECTROS DE INFRAVERMELHO







# ESPECTROS DE RMN

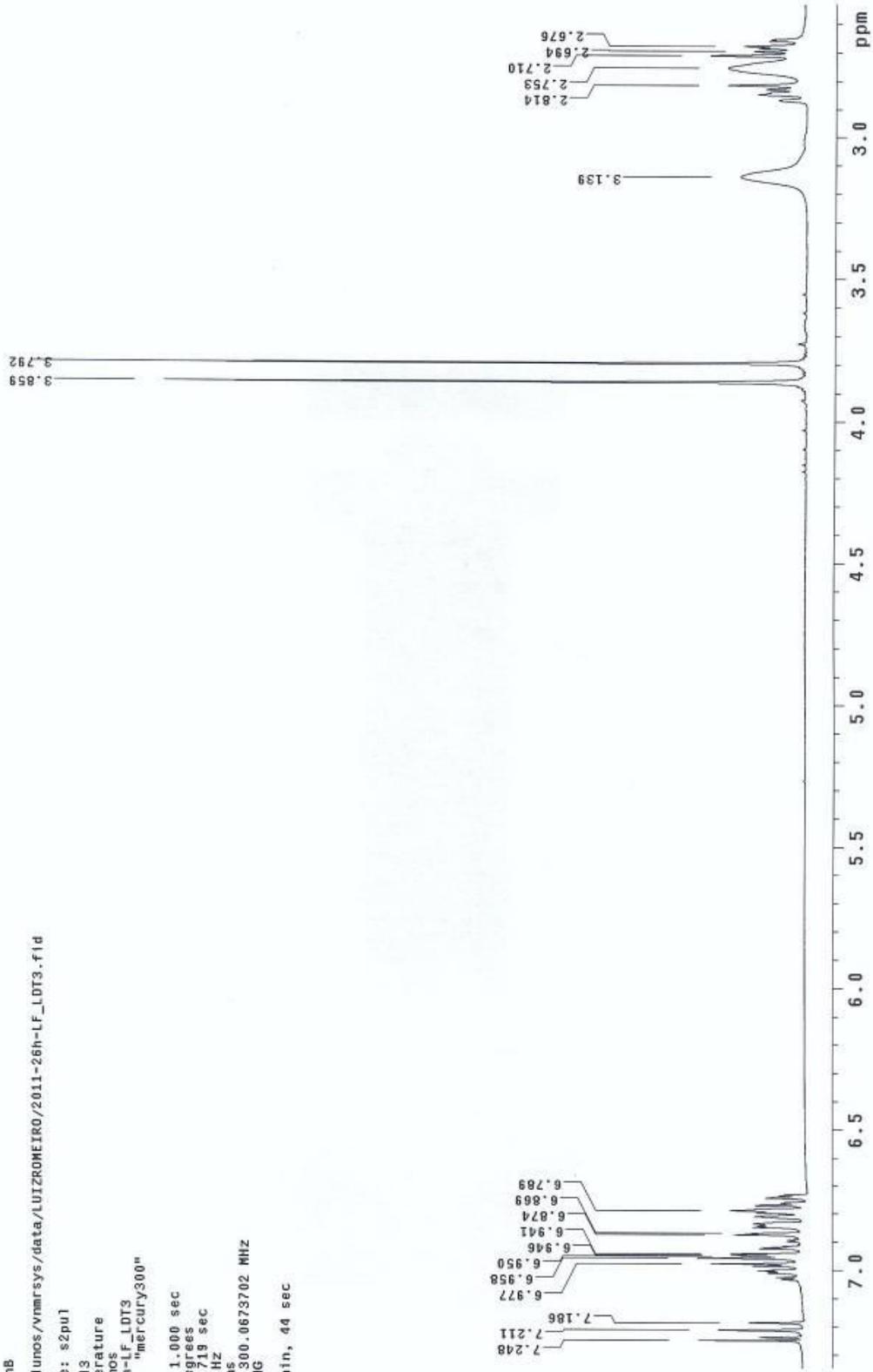
2011-26h-LF\_LDT3  
Luiz  
Farmacia-FS-UnB

File: /home/alunos/vnmrSYS/data/LUIZROMEIRO/2011-26h-LF\_LDT3.fid

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdc13  
Ambient temperature  
Operator: alunos  
File: 2011-26h-LF\_LDT3  
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 10.719 sec  
Width 3032.1 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE H1 300.0673702 MHZ  
DATA PROCESSING  
FT size 65536  
Total time 3 min, 44 sec



2010-47h-LDT-5  
Luiz  
Farmacia-FS-UnB  
60 mg

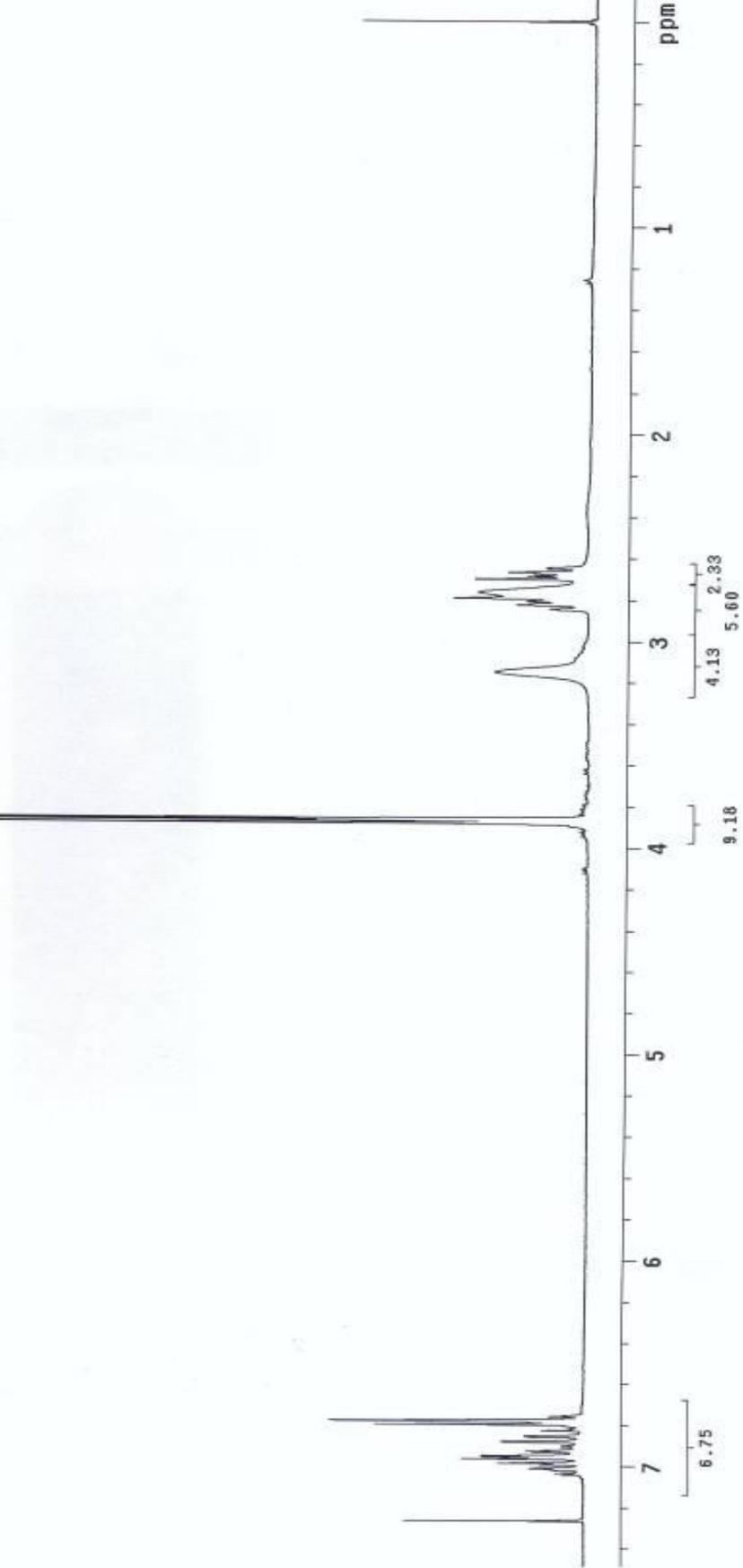
File: /home/alunos/vnmrSys/data/LUIZROMEIRO/2010-47h-LDT-5.fid

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdc13  
Ambient temperature  
Operator: alunos  
File: 2010-47h-LDT-5  
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 11.567 sec  
Width 2686.1 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE H1, 300.0673654 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 65536  
Total time 3 min, 58 sec

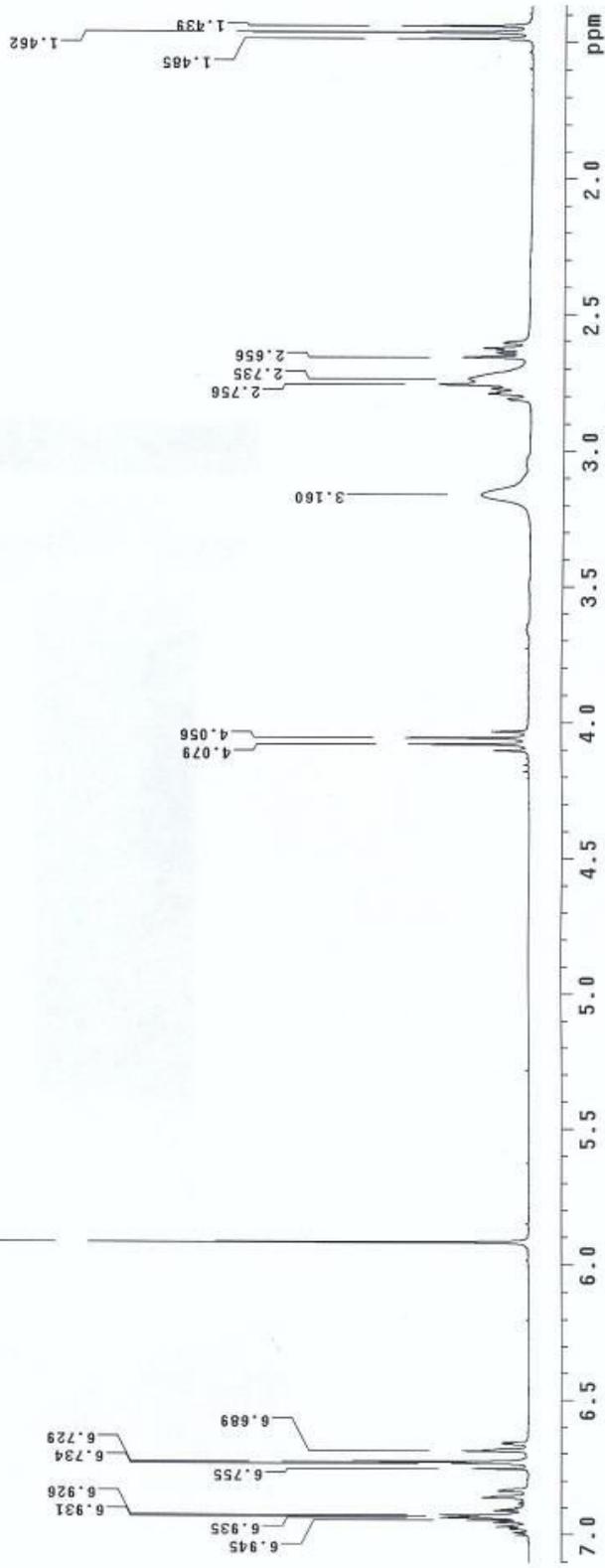
0.998  
0.998  
0.998



2011-26h-LF\_LDT8  
LuiZ  
Farmacia-FS-UnB  
File: /home/alunos/vnmrSYS/data/LUIZROMEIRO/2011-26h-LF\_LDT8.f1d

Pulse Sequence: s2pul  
Solvent: cdcl3  
Ambient temperature  
Operator: alunos  
File: 2011-26h-LF\_LDT8  
Mercury-30088 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 10.852 sec  
Width 2994.9 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE H1, 300.0673677 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 65536  
Total time 3 min, 46 sec





Resultados CEREP - Binding													
Experiment Date	Assay	Catalog Ref	Client Compound I.D.	Cerep Compound I.D.	Test Concentration (M)	% Inhibition of Control Specific Binding	% of Control Specific Binding			Reference Compound	IC50 Ref (M)	Ki Ref (M)	nH Ref
							1st	2nd	Mean				
15/09/2014	A2A (h) (agonist radioligand)	0004	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-4	104.9	102.5	103.7	NECA	2.2E-08	1.8E-08	1.0
15/09/2014	A2A (h) (agonist radioligand)	0004	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-1	98.9	103.5	101.2	NECA	2.2E-08	1.8E-08	1.0
18/09/2014	alpha 1A (h) (antagonist radioligand)	2338	LDT3	100018032-1	1.0E-06	103	-1.9	-4.9	-3.4	WB 4101	1.2E-10	5.8E-11	0.8
18/09/2014	alpha 1A (h) (antagonist radioligand)	2338	LDT5	100018032-2	1.0E-06	103	-1.9	-4.1	-3.0	WB 4101	1.2E-10	5.8E-11	0.8
18/09/2014	alpha 2A (h) (antagonist radioligand)	0013	LDT3	100018032-1	1.0E-06	68	30.2	33.3	31.8	yohimbine	5.5E-09	2.4E-09	0.8
18/09/2014	alpha 2A (h) (antagonist radioligand)	0013	LDT5	100018032-2	1.0E-06	82	19.0	16.7	17.9	yohimbine	5.5E-09	2.4E-09	0.8
16/09/2014	beta 1 (h) (agonist radioligand)	0018	LDT3	100018032-1	1.0E-06	47	53.4	52.7	53.0	atenolol	3.5E-07	2.0E-07	0.9
18/09/2014	beta 1 (h) (agonist radioligand)	0018	LDT5	100018032-2	1.0E-06	74	27.4	24.6	26.0	atenolol	3.9E-07	2.2E-07	0.8
16/09/2014	beta 2 (h) (agonist radioligand)	0020	LDT3	100018032-1	1.0E-06	7	93.5	92.0	92.8	ICI 118551	7.2E-10	2.4E-10	1.3
16/09/2014	beta 2 (h) (agonist radioligand)	0020	LDT5	100018032-2	1.0E-06	4	100.7	91.8	96.2	ICI 118551	7.2E-10	2.4E-10	1.3
16/09/2014	BZD (central) (agonist radioligand)	0028	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-12	108.2	115.6	111.9	diazepam	7.4E-09	6.2E-09	0.8
16/09/2014	BZD (central) (agonist radioligand)	0028	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-13	114.9	110.9	112.9	diazepam	7.4E-09	6.2E-09	0.8
16/09/2014	CB1 (h) (agonist radioligand)	0036	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-20	133.6	107.1	120.3	CP 55940	7.3E-10	6.4E-10	1.0
16/09/2014	CB1 (h) (agonist radioligand)	0036	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-11	118.1	103.1	110.6	CP 55940	7.3E-10	6.4E-10	1.0
16/09/2014	CB2 (h) (agonist radioligand)	0037	LDT3	100018032-1	1.0E-06	6	94.8	94.1	94.4	WIN 55212-2	2.6E-09	1.7E-09	0.9
16/09/2014	CB2 (h) (agonist radioligand)	0037	LDT5	100018032-2	1.0E-06	2	96.1	100.9	98.5	WIN 55212-2	2.6E-09	1.7E-09	0.9
16/09/2014	CCK1 (CCKA) (h) (agonist radioligand)	0039	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-14	108.8	118.4	113.6	CCK-8s	7.5E-11	5.6E-11	0.9
16/09/2014	CCK1 (CCKA) (h) (agonist radioligand)	0039	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-17	116.7	117.0	116.8	CCK-8s	7.5E-11	5.6E-11	0.9
16/09/2014	D1 (h) (antagonist radioligand)	0044	LDT3	100018032-1	1.0E-06	53	46.3	47.4	46.8	SCH 23390	4.6E-10	1.8E-10	0.9
16/09/2014	D1 (h) (antagonist radioligand)	0044	LDT5	100018032-2	1.0E-06	35	65.0	65.9	65.5	SCH 23390	4.6E-10	1.8E-10	0.9
18/09/2014	D2S (h) (agonist radioligand)	1322	LDT3	100018032-1	1.0E-06	96	8.4	0.5	4.5	7-OH-DPAT	1.6E-09	6.6E-10	0.7
18/09/2014	D2S (h) (agonist radioligand)	1322	LDT5	100018032-2	1.0E-06	98	2.7	0.4	1.5	7-OH-DPAT	1.6E-09	6.6E-10	0.7
16/09/2014	ETA (h) (agonist radioligand)	0054	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-6	103.1	109.7	106.4	endothelin-1	5.3E-11	2.6E-11	0.9
16/09/2014	ETA (h) (agonist radioligand)	0054	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-13	106.4	120.1	113.3	endothelin-1	5.3E-11	2.6E-11	0.9
17/09/2014	NMDA (antagonist radioligand)	0066	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-50	124.9	174.2	149.6	CGS 19755	1.5E-07	1.2E-07	1.7
17/09/2014	NMDA (antagonist radioligand)	0066	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-18	122.2	114.2	118.2	CGS 19755	1.5E-07	1.2E-07	1.7
16/09/2014	H1 (h) (antagonist radioligand)	0870	LDT3	100018032-1	1.0E-06	80	18.7	20.3	19.5	pyrilamine	4.0E-09	2.5E-09	1.4
16/09/2014	H1 (h) (antagonist radioligand)	0870	LDT5	100018032-2	1.0E-06	47	54.0	51.8	52.9	pyrilamine	4.0E-09	2.5E-09	1.4
16/09/2014	H2 (h) (antagonist radioligand)	1208	LDT3	100018032-1	1.0E-06	14	84.4	87.5	85.9	cimetidine	6.7E-07	6.5E-07	0.8
16/09/2014	H2 (h) (antagonist radioligand)	1208	LDT5	100018032-2	1.0E-06	7	92.6	93.9	93.3	cimetidine	6.7E-07	6.5E-07	0.8
18/09/2014	MAO-A (antagonist radioligand)	0443	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-3	101.5	104.5	103.0	clorgyline	1.3E-09	7.8E-10	2.2
18/09/2014	MAO-A (antagonist radioligand)	0443	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-2	107.3	96.4	101.8	clorgyline	1.3E-09	7.8E-10	2.2
16/09/2014	M1 (h) (antagonist radioligand)	0091	LDT3	100018032-1	1.0E-06	17	85.7	81.1	83.4	pirenzepine	1.7E-08	1.5E-08	1.0
16/09/2014	M1 (h) (antagonist radioligand)	0091	LDT5	100018032-2	1.0E-06	16	84.6	83.2	83.9	pirenzepine	1.7E-08	1.5E-08	1.0
16/09/2014	M2 (h) (antagonist radioligand)	0093	LDT3	100018032-1	1.0E-06	13	93.9	80.6	87.3	methoctramine	7.3E-08	5.1E-08	1.0
16/09/2014	M2 (h) (antagonist radioligand)	0093	LDT5	100018032-2	1.0E-06	6	99.3	88.5	93.9	methoctramine	7.3E-08	5.1E-08	1.0
16/09/2014	M3 (h) (antagonist radioligand)	0095	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-2	115.9	88.3	102.1	4-DAMP	4.2E-10	3.0E-10	1.1
16/09/2014	M3 (h) (antagonist radioligand)	0095	LDT5	100018032-2	1.0E-06	6	102.2	86.7	94.5	4-DAMP	4.2E-10	3.0E-10	1.1
12/09/2014	N neuronal alpha 4beta 2 (h) (agonist radioligand)	3029	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-2	98.5	106.4	102.5	nicotine	6.2E-09	2.1E-09	1.0
12/09/2014	N neuronal alpha 4beta 2 (h) (agonist radioligand)	3029	LDT5	100018032-2	1.0E-06	7	84.1	101.7	92.9	nicotine	6.2E-09	2.1E-09	1.0
16/09/2014	delta 2 (DOP) (h) (agonist radioligand)	0114	LDT3	100018032-1	1.0E-06	3	92.8	100.7	96.8	DPDPE	2.7E-09	1.6E-09	1.2
16/09/2014	delta 2 (DOP) (h) (agonist radioligand)	0114	LDT5	100018032-2	1.0E-06	3	101.7	92.4	97.1	DPDPE	2.7E-09	1.6E-09	1.2
16/09/2014	kappa (KOP) (agonist radioligand)	1971	LDT3	100018032-1	1.0E-06	30	75.7	64.5	70.1	U 50488	6.8E-10	4.5E-10	1.2
16/09/2014	kappa (KOP) (agonist radioligand)	1971	LDT5	100018032-2	1.0E-06	7	98.4	86.8	92.6	U 50488	6.8E-10	4.5E-10	1.2
16/09/2014	mu (MOP) (h) (agonist radioligand)	0118	LDT3	100018032-1	1.0E-06	54	43.3	48.1	45.7	DAMGO	1.1E-09	4.6E-10	1.1
16/09/2014	mu (MOP) (h) (agonist radioligand)	0118	LDT5	100018032-2	1.0E-06	23	77.3	77.4	77.3	DAMGO	1.1E-09	4.6E-10	1.1
16/09/2014	5-HT1A (h) (agonist radioligand)	0131	LDT3	100018032-1	1.0E-06	100	0.0	-0.3	-0.2	8-OH-DPAT	5.4E-10	3.4E-10	1.2
16/09/2014	5-HT1A (h) (agonist radioligand)	0131	LDT5	100018032-2	1.0E-06	100	0.6	-0.7	0.0	8-OH-DPAT	5.4E-10	3.4E-10	1.2
16/09/2014	5-HT1B (antagonist radioligand)	0132	LDT3	100018032-1	1.0E-06	56	49.8	38.1	43.9	serotonin	1.0E-08	6.4E-09	0.9
16/09/2014	5-HT1B (antagonist radioligand)	0132	LDT5	100018032-2	1.0E-06	11	90.8	87.0	88.9	serotonin	1.0E-08	6.4E-09	0.9
18/09/2014	5-HT2A (h) (agonist radioligand)	0471	LDT3	100018032-1	1.0E-06	87	13.5	11.6	12.5	(±)DOI	1.1E-10	8.1E-11	1.1
18/09/2014	5-HT2A (h) (agonist radioligand)	0471	LDT5	100018032-2	1.0E-06	50	47.8	51.4	49.6	(±)DOI	1.1E-10	8.1E-11	1.1
18/09/2014	5-HT2B (h) (agonist radioligand)	1333	LDT3	100018032-1	1.0E-06	97	4.2	1.7	2.9	(±)DOI	6.7E-09	3.4E-09	1.0
18/09/2014	5-HT2B (h) (agonist radioligand)	1333	LDT5	100018032-2	1.0E-06	97	5.6	1.2	3.4	(±)DOI	6.7E-09	3.4E-09	1.0
16/09/2014	5-HT3 (h) (antagonist radioligand)	0411	LDT3	100018032-1	1.0E-06	11	95.9	81.7	88.8	MDL 72222	8.3E-09	5.8E-09	1.1
16/09/2014	5-HT3 (h) (antagonist radioligand)	0411	LDT5	100018032-2	1.0E-06	17	89.0	77.1	83.0	MDL 72222	8.3E-09	5.8E-09	1.1
12/09/2014	GR (h) (agonist radioligand)	0469	LDT3	100018032-1	1.0E-06	1	99.5	97.7	98.6	dexamethasone	2.0E-09	1.0E-09	0.7
12/09/2014	GR (h) (agonist radioligand)	0469	LDT5	100018032-2	1.0E-06	3	92.5	100.8	96.6	dexamethasone	2.0E-09	1.0E-09	0.7
16/09/2014	AR (h) (agonist radioligand)	0933	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-7	102.7	111.8	107.3	mibolerone	1.9E-09	8.2E-10	1.1
16/09/2014	AR (h) (agonist radioligand)	0933	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-18	125.8	109.6	117.7	mibolerone	1.9E-09	8.2E-10	1.1
16/09/2014	V1a (h) (agonist radioligand)	0159	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-2	104.9	98.1	101.5	[d(CH2)51,Tyr(Me)2]-AVP	1.1E-09	6.7E-10	1.1
16/09/2014	V1a (h) (agonist radioligand)	0159	LDT5	100018032-2	1.0E-06	5	96.8	93.8	95.3	[d(CH2)51,Tyr(Me)2]-AVP	1.1E-09	6.7E-10	1.1
15/09/2014	Ca2+ channel (L, dihydropyridine site) (antagonist radioligand)	0161	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-8	109.3	106.1	107.7	nitrendipine	3.2E-10	2.2E-10	0.9
15/09/2014	Ca2+ channel (L, dihydropyridine site) (antagonist radioligand)	0161	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-4	105.0	103.0	104.0	nitrendipine	3.2E-10	2.2E-10	0.9
18/09/2014	hERG (membrane preparation) (antagonist radioligand)	1868	LDT3	100018032-1	1.0E-06	0	106.7	93.0	99.9	astemizole	3.6E-09	1.8E-09	0.6
18/09/2014	hERG (membrane preparation) (antagonist radioligand)	1868	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-8	103.1	112.4	107.8	astemizole	3.6E-09	1.8E-09	0.6

16/09/2014	KV channel (antagonist radioligand)	0166	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-13	123.5	102.9	113.2	alpha -dendrotoxin	2.1E-10	1.6E-10	2.4
16/09/2014	KV channel (antagonist radioligand)	0166	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-13	111.9	114.3	113.1	alpha -dendrotoxin	2.1E-10	1.6E-10	2.4
16/09/2014	Na+ channel (site 2) (antagonist radioligand)	0169	LDT3	100018032-1	1.0E-06	30	66.1	73.1	69.6	veratridine	7.9E-06	7.1E-06	1.3
16/09/2014	Na+ channel (site 2) (antagonist radioligand)	0169	LDT5	100018032-2	1.0E-06	18	84.6	79.1	81.8	veratridine	7.9E-06	7.1E-06	1.3
16/09/2014	norepinephrine transporter (h) (antagonist radioligand)	0355	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-2	98.3	105.9	102.1	protriptyline	2.4E-09	1.8E-09	1.1
16/09/2014	norepinephrine transporter (h) (antagonist radioligand)	0355	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-11	109.0	113.0	111.0	protriptyline	2.4E-09	1.8E-09	1.1
16/09/2014	dopamine transporter (h) (antagonist radioligand)	0052	LDT3	100018032-1	1.0E-06	9	92.2	90.6	91.4	BTCP	9.4E-09	5.0E-09	1.1
16/09/2014	dopamine transporter (h) (antagonist radioligand)	0052	LDT5	100018032-2	1.0E-06	5	94.8	95.7	95.3	BTCP	9.4E-09	5.0E-09	1.1
16/09/2014	5-HT transporter (h) (antagonist radioligand)	0439	LDT3	100018032-1	1.0E-06	49	53.5	49.4	51.5	imipramine	2.5E-09	1.1E-09	1.2
16/09/2014	5-HT transporter (h) (antagonist radioligand)	0439	LDT5	100018032-2	1.0E-06	54	44.5	47.2	45.8	imipramine	2.5E-09	1.1E-09	1.2

Resultados CEREP - Enzyme and Cell-based assays												
Experiment Date	Assay	Catalog Ref	Client Compound I.D.	Cerep Compound I.D.	Test Concentration (M)	% Inhibition of Control Values	% of Control Values			Reference Compound	IC50 Ref (M)	nH Ref
							1st	2nd	Mean			
19/09/2014	COX1 (h)	0726	LDT3	100018032-1	1.0E-06	13	86.1	88.5	87.3	diclofenac	2.3E-08	1.5
19/09/2014	COX1 (h)	0726	LDT5	100018032-2	1.0E-06	3	97.2	96.1	96.7	diclofenac	2.3E-08	1.5
12/09/2014	COX2 (h)	0727	LDT3	100018032-1	1.0E-06	1	117.6	80.3	98.9	NS 398	8.4E-08	1.5
12/09/2014	COX2 (h)	0727	LDT5	100018032-2	1.0E-06	21	83.6	74.9	79.3	NS 398	8.4E-08	1.5
12/09/2014	PDE3A (h)	2432	LDT3	100018032-1	1.0E-06	-1	101.4	99.8	100.6	milrinone	2.8E-07	0.9
12/09/2014	PDE3A (h)	2432	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-3	103.7	102.6	103.1	milrinone	2.8E-07	0.9
12/09/2014	PDE4D2 (h)	2434	LDT3	100018032-1	1.0E-06	0	101.1	99.2	100.1	rolipram	1.3E-07	0.6
12/09/2014	PDE4D2 (h)	2434	LDT5	100018032-2	1.0E-06	0	100.6	98.5	99.5	rolipram	1.3E-07	0.6
12/09/2014	Lck kinase (h)	2906	LDT3	100018032-1	1.0E-06	3	97.8	96.2	97.0	staurosporine	4.6E-08	0.4
12/09/2014	Lck kinase (h)	2906	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-17	117.9	116.8	117.3	staurosporine	4.6E-08	0.4
12/09/2014	acetylcholinesterase (h)	0363	LDT3	100018032-1	1.0E-06	10	92.0	88.4	90.2	neostigmine	2.0E-08	1.1
12/09/2014	acetylcholinesterase (h)	0363	LDT5	100018032-2	1.0E-06	-4	113.0	95.7	104.3	neostigmine	2.0E-08	1.1



# New Multi-target Antagonists of $\alpha_{1A}$ -, $\alpha_{1D}$ -Adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> Receptors Reduce Human Hyperplastic Prostate Cell Growth and the Increase of Intraurethral Pressure<sup>§</sup>

Jéssica B. Nascimento-Viana, Aline R. Carvalho, Luiz Eurico Nasciutti, Rocío Alcántara-Hernández, Fernanda Chagas-Silva, Pedro A. R. Souza, Luiz Antonio S. Romeiro, J. Adolfo García-Sáinz, François Noël, and Claudia Lucia Martins Silva

Laboratory of Molecular and Biochemical Pharmacology (J.B.N.-V., A.R.C., F.C.-S., F.N., C.L.M.S.) and Cell Biology and Development Research Program (P.A.R.S., L.E.N.), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Cell Physiology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico (R.A.-H., J.A.G.-S.); and Pharmaceutical Sciences, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil (L.A.S.R.)

Received July 1, 2015; accepted October 21, 2015

## ABSTRACT

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is characterized by stromal cell proliferation and contraction of the periurethral smooth muscle, causing lower urinary tract symptoms. Current BPH treatment, based on monotherapy with  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonists, is helpful for many patients, but insufficient for others, and recent reports suggest that stimulation of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-hydroxytryptamine (serotonin) (5-HT)<sub>1A</sub> receptors contributes to cell proliferation. In this study, we investigated the potential of three *N*-phenylpiperazine derivatives (LDT3, LDT5, and LDT8) as multi-target antagonists of BPH-associated receptors. The affinity and efficacy of LDTs were estimated in isometric contraction and competition-binding assays using tissues (prostate and aorta) and brain membrane samples enriched in specific on- or off-target receptors. LDTs' potency was estimated in intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation assays using cells overexpressing human  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. The

antiproliferative effect of LDTs on prostate cells from BPH patients was evaluated by viable cell counting and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assays. We also determined LDTs' effects on rat intraurethral and arterial pressure. LDT3 and LDT5 are potent antagonists of  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, and 5-HT<sub>1A</sub> receptors ( $K_i$  values in the nanomolar range), and fully inhibited phenylephrine- and 5-HT-induced proliferation of BPH cells. In vivo, LDT3 and LDT5 fully blocked the increase of intraurethral pressure (IUP) induced by phenylephrine at doses (ED<sub>50</sub> of 0.15 and 0.09  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively) without effect on basal mean blood pressure. LDT3 and LDT5 are multi-target antagonists of key receptors in BPH, and are capable of triggering both prostate muscle relaxation and human hyperplastic prostate cell growth inhibition in vitro. Thus, LDT3 and LDT5 represent potential new lead compounds for BPH treatment.

## Introduction

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a progressive disease with considerable impact on the quality of life of a large portion of aging men (Nickel, 2003). The condition stems from an imbalance between cell proliferation and apoptosis

(Roehrborn, 2008; Sciarra et al., 2008). Among several factors, the proliferation of periurethral prostate stromal cells and the prostatic smooth muscle contraction contribute to the lower urinary tract symptoms (LUTS) suggestive of BPH (LUTS/BPH) (Roehrborn, 2008).

$\alpha_{1A}$ -Adrenoceptor is the predominant subtype expressed in human prostate, particularly in the stroma (Price et al., 1993; Tseng-Crank et al., 1995), and mediates prostate muscle contraction (Forray et al., 1994). These receptors are also highly expressed in hyperplastic prostate, and, under this condition, their mRNA level corresponds to approximately 85% of the total prostate  $\alpha_1$ -adrenoceptor mRNA content (Nasu et al., 1996).

Both the American and European Urological Associations consider  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism as an appropriate pharmacological treatment to control moderate to severe

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) [455436/2014-2; 307668/2012-6; 473053/2004-7], Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) [E-26/110.378/2014], National Council for Science and Technology (CONACyT) [177556], and DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [IN200812-IN200915]. hERG K<sup>+</sup> channel (performed by CEREP, France), rat intraurethral pressure and blood pressure assays (dose-response curves) were sponsored by Biozeus Desenvolvimento de Produtos Biofarmacêuticos S.A. (Brazil) [BZ073PHA].  
[dx.doi.org/10.1124/jpet.115.227066](http://dx.doi.org/10.1124/jpet.115.227066).

§ This article has supplemental material available at [jpet.aspetjournals.org](http://jpet.aspetjournals.org).

**ABBREVIATIONS:** ANOVA, analysis of variance; BMY7378, 8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione dihydrochloride; BPH, benign prostatic hyperplasia; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration; 8-OH-DPAT, 8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin hydrobromide; 5-HT, 5-hydroxytryptamine (serotonin); IUP, intraurethral pressure; LUTS, lower urinary tract symptoms; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; *p*-MPPF, 4-fluoro-N-(2-[4-(2-methoxyphenyl)1-piperazinyl]ethyl)-N-(2-pyridinyl)benzamide dihydrochloride; RX821002, 2-methoxy idazoxan.

LUTS/BPH (McVary et al., 2011; Oelke et al., 2013). Nevertheless, the introduction of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonists such as tamsulosin, or the uroselective  $\alpha_1$ -adrenoceptor blocker alfuzosin, was a major advance in the management of BPH, mainly due to the better tolerability by patients (Michel 2010; Jelski and Speakman, 2012). However, the pharmacological management of LUTS/BPH by monotherapy with  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonists is helpful for many patients, but insufficient for others (Jelski and Speakman, 2012; Perabo, 2012). Two important factors of LUTS/BPH not addressed by  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor blockers are sheer prostate size and detrusor muscle contraction (McVary et al., 2011; Oelke et al., 2013).

The possibility that  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors also might play a role in the pathogenesis of BPH has been suggested. According to data obtained by RNase protection, in situ hybridization or reverse-transcription polymerase chain reaction assays, the expression level of  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ -, and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor mRNA differs among hyperplastic prostate samples; however, the prostatic expression of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor mRNA is frequently increased in such condition (Nasu et al., 1996; Kojima et al., 2006, 2009a). Some reports have suggested that  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor blockade may improve BPH treatment by inhibiting prostate cell growth in vitro and in vivo (Kojima et al., 2009a). In contrast, tamsulosin, one of the most widely used drugs for BPH treatment, is not as effective in this model (Kojima et al., 2009a). However, it should be mentioned that detection of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor protein is controversial due to the lack of highly selective antibodies validated under stringent conditions (Pradidarcheap et al., 2009; Böhmer et al., 2014). The discrepancies in the reported mRNA and protein expression in the prostate warrant that caution needs to be exercised until additional data are obtained. Human bladder also expresses  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (Malloy et al., 1998), and both the expression and function increase due to bladder outlet obstruction, both in rats and humans (Hampel et al., 2002; Barendrecht et al., 2009).

In the case of multifactorial diseases such as BPH (Roehrborn, 2008), a multi-target strategy seems more appropriate (Peters, 2013). For the treatment of BPH, the use of antagonists that concomitantly relax the prostate and slow prostate enlargement might be more effective than monotherapy targeting solely the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors (Hieble, 2011), so that we hypothesized that not only  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, but also 5-HT<sub>1A</sub> receptors, could be additional targets. In fact, neuroendocrine cells populate normal and malignant prostate tissue releasing 5-HT (Abrahamsson et al., 1986), and prostate cells, including those from BPH patients, express 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Dizeyi et al., 2004). Moreover, 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation appears to increase prostate cell proliferation, via stimulation of the Akt/mitogen-activated protein kinase pathway (Hsiung et al., 2005; Dizeyi et al., 2011), and the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist NAN190 reduces prostate cell proliferation (Dizeyi et al., 2004). Based on these data, 5-HT<sub>1A</sub> receptors are considered as an attractive target for drug development in such context (Fiorino et al., 2014).

Previously, we showed that the N1-(2-methoxyphenyl)-N4-piperazine moiety confers affinity for  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, and 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Chagas-Silva et al., 2014). In this work, we investigate the in vitro and in vivo pharmacological characteristics of three N-phenylpiperazine derivatives, LDT3, LDT5, and LDT8 (European patent office, application

13733873.7-1451; USPTO application 14370646). Our results show that LDT3 and LDT5 are very potent multi-target antagonists of both  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, and also of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Also, these compounds inhibit the increase of rat IUP (as a result of prostate contraction) in vivo and human hyperplastic prostate cell proliferation in vitro. As a conclusion, we elected the multi-target LDT3 and LDT5 as potential lead compounds to reduce LUTS/BPH and BPH progression.

## Materials and Methods

**Patient Samples and Human Cell Lines.** Prostate tissue samples were collected from three patients with LUTS secondary to BPH during transurethral resection, in accordance with the Declaration of Helsinki (de Souza et al., 2011). Informed consent was obtained from donors (Ethics Committee of Universidade Federal do Rio de Janeiro, CAAE-0029.0.197.000-05; 2009). The androgen-independent prostate cancer cell line DU-145 (human) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

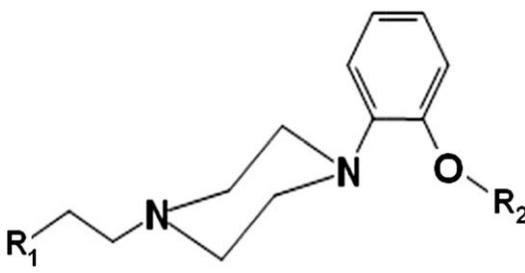
**Animals.** All experiments were conducted in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and with institutional ethical standards established by the Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro, under the license DFBC-ICB-011 (2008). Animals were kept under a 12/12-hour light/dark cycle, with water and food ad libitum, and in agreement with the guidelines of the National Council on Experimental Animal Control (CONCEA, Brazil) and the Committee of Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council). Male Wistar rats (250–300 g; 2–3 months) were used in this study. For brain and liver removal, rats were anesthetized with ether and killed by decapitation.

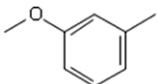
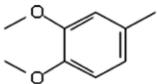
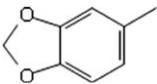
**Test Compounds.** The N-phenylpiperazine derivatives LDT3, LDT5, and LDT8 (Table 1) were synthesized by LADETER (Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil), and were available in the monohydrochloride form, as previously described for other N-phenylpiperazine derivatives (Romeiro et al., 2011). Fourier transform infrared spectroscopy spectra (Supplemental Fig. 1) were recorded on a Spectrum BX spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA); <sup>1</sup>H-NMR (300 and 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Supplemental Fig. 2) and <sup>13</sup>C-NMR (75 and 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra were recorded on plus Varian (7.05 T) and Bruker Avance DRX500 and DRX300 spectrometers; and the mass spectra were recorded on a Shimadzu LCMS IT-TOF spectrometer. The spectrometric analysis revealed the presence of only one compound in each sample.

**Drugs and Radioligands.** Prazosin hydrochloride, pargyline hydrochloride, 5-hydroxytryptamine hydrochloride (5-HT), acetylcholine chloride, (R)-(-)-phenylephrine hydrochloride, L-adrenaline (+)bitartrate, (±)-propranolol hydrochloride, 4-fluoro-N-(2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl)-N-(2-pyridinyl)benzamide dihydrochloride (*p*-MPPF), 8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione dihydrochloride (BMY7378), 8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT), 2-methoxy idazoxan (RX821002), 3-quinuclidinyl benzilate (QNB), tamsulosin hydrochloride, ketanserin tartrate, polyethyleneimine, atropine sulfate, and GTP were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). [<sup>3</sup>H]-prazosin (85 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-ketanserin (60 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (187 Ci/mmol), and [<sup>3</sup>H]*p*-MPPF (74.2 Ci/mmol) were obtained from PerkinElmer. [<sup>3</sup>H]RX821002 (60 Ci/mmol) and [<sup>3</sup>H]-quinuclidinyl benzilate ([<sup>3</sup>H]-QNB, 250 Ci/mmol) were obtained from Amersham (Chalfont, UK).

**Isometric Contraction Assays.** Rat prostate and thoracic aorta were removed, cleaned, and cut into 10-mm strips (prostate) or 3-mm rings (aorta). Isometric contraction assays were performed as described previously (Chagas-Silva et al., 2014). Samples were placed in an organ bath containing a physiologic solution ([prostate, mM]: NaCl 138, KCl 5.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.36, NaHCO<sub>3</sub> 15 and glucose 5.5; [aorta, mM]: NaCl 122, KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 15, glucose 11.5, MgCl<sub>2</sub> 1.25, CaCl<sub>2</sub> 1.25 and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25) (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Prostate

TABLE 1

Chemical structure of the *N*-phenylpiperazine derivatives LDT3, LDT5, LDT8, and LDT66


LDT	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Name
3		-CH <sub>3</sub>	1-(2-methoxyphenyl)-4-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]piperazine
5		-CH <sub>3</sub>	1-(2-methoxyphenyl)-4-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]piperazine
8		-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1-(1,3-benzodioxol-5-ylethyl)-4-ethoxyphenylpiperazine
66 <sup>a</sup>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	1-(2-methoxyphenyl)-4-hexylpiperazine

<sup>a</sup>From Chagas-Silva et al., 2014, with permission.

and denuded aorta segments were preloaded (60 minutes) with 10 or 20 mN, respectively, and washed twice. Tissues were contracted with 1  $\mu$ M phenylephrine (aorta) or 60 mM KCl depolarizing solution (prostate). After a 60-minute recovery period, aorta and prostate samples were contracted with cumulative concentrations of phenylephrine ( $10^{-9}$ – $10^{-3}$  M) in the presence of 1  $\mu$ M propranolol, before and after incubation for 60 minutes with the test compounds (10 or 50 nM), BMY7378 or tamsulosin (10 nM). The developed force was recorded using a FT-03 grass force transducer (Warwick, RI) connected to a data acquisition system (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, Australia). Data were analyzed by nonlinear regression (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA), and the maximal contraction obtained in each control curve (before treatment) was defined as the top. The phenylephrine concentration that produced 50% of the maximal contraction ( $EC_{50}$ ) was estimated before and after treatment with the antagonists. An  $EC_{50}$  ratio (CR) was calculated for each drug concentration by dividing the  $EC_{50}$  value after treatment by the control value (before treatment). Drug affinity ( $K_B$ ) was estimated using the Schild equation:  $\log(CR-1) = \log[B] - \log K_B$  (Kenakin, 1993), where B is the antagonist.

**Intracellular Ca<sup>2+</sup> Measurement.** The effect of LDTs on human  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes was determined by measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat-1 fibroblasts stably expressing  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , or  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (Vázquez-Prado et al., 1997). These cells were cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine supplemented with 10% fetal bovine serum, 300  $\mu$ g/ml neomycin analog G418 sulfate, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B, at 37°C, and under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Cells were loaded with 2.5  $\mu$ M fura-2/AM for 60 minutes at 37°C, in 20 mM HEPES (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.75 mM KCl, 10 mM glucose, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.05% bovine serum albumin (pH 7.4). Then cells were detached by gentle trypsinization, washed to remove unincorporated dye, and incubated ( $10^6$  cells/condition) with vehicle, LDTs ( $10^{-9}$ – $10^{-5}$  M), BMY7378 ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  M), or tamsulosin ( $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M) for

100 seconds, before stimulation with 100  $\mu$ M phenylephrine. Fluorophore excitation was performed at 340 and 380 nm and measured at 510 nm emission wavelength, at 0.5-second intervals, using an Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrometer (Rochester, NY). Peak fluorescence values were used for data analysis, and the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) was calculated, as described previously (Gryniewicz et al., 1985). Data were analyzed by computerized nonlinear regression of untransformed data (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software), to estimate the  $IC_{50}$  of test compounds based on individual curves obtained from *n* experiments.

**Intraurethral and Blood Pressure Assays.** Male Wistar rats were cannulated, as described previously (Chagas-Silva et al., 2014). For these assays, each animal was used only once, and all drugs were diluted in isotonic saline. Blood and IUP (in mmHg) were monitored continuously using a fluid-filled pressure transducer (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, Australia).

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup> body weight, i.p.), and body temperature was kept constant at 37°C. The jugular vein was cannulated with polyethylene cannulae containing a heparinized saline solution (50 U/ml). Anesthesia was complemented with sodium pentobarbital before treatments. The pressure transducer was placed into the right carotid artery. After blood pressure stabilization (30 minutes), 0.1  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> LDT3, 0.1–100  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> LDT5, or 100  $\mu$ l vehicle (saline) was injected i.v. in bolus. Data were analyzed by LabChart software. Mean arterial (blood) pressure was calculated by arithmetic mean of the diastolic and systolic pressures in the respective cycles, and changes were expressed as percentage of the alteration of the baseline (resting) values ( $130.2 \pm 2.2$  mmHg, *n* = 20).

For IUP determination, the prostate and bladder were exposed through a midline incision in the lower abdomen. The pressure catheter was placed into the prostatic urethra through the bladder and fixed at the vesical-urethral junction with a suture. The distal side of the urethra was also closed with a suture. The IUP was equilibrated at 20 mmHg by injecting a small volume of saline. After approximately

30 minutes, IUP was increased by an i.v. administration of 1–100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  phenylephrine every 10 minutes. Alternatively, a single dose of 30  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  phenylephrine was injected 10 minutes after the administration of 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LDT3 and LDT5 as a first evaluation of the pharmacological effect. Then full dose-response curves were constructed using LDT3 or LDT5 (0.01–3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.v.) or tamsulosin (0.001–0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.v.). Data were analyzed by nonlinear regression (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software) to determine the  $\text{ED}_{50}$ .

**Binding Assays with Native Receptors.** Rat brains were removed to obtain the hippocampus (5-HT<sub>1A</sub> receptor) and cortex (5-HT<sub>2A</sub>,  $\alpha_2$ -adrenoceptor and muscarinic receptors; Supplemental Methods) and stored in liquid nitrogen. Hippocampal and cortical membrane samples were prepared, as previously described (Neves et al., 2010). After incubation, binding samples were diluted (3 times in 4 ml) in ice-cold 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and subjected to rapid filtration under vacuum using glass fiber filters (GMF 3; Filtrak, Thermalbad Wiesenbad, Germany) presoaked in 0.5% polyethyleneimine (<sup>3</sup>H]-ketanserin, [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT, and [<sup>3</sup>H]-RX821002 assays) or binding buffer (<sup>3</sup>H]-p-MPPF and [<sup>3</sup>H]-prazosin assays). Radioactivity was determined using a Tri-Carb B2810 TR liquid scintillation counter (PerkinElmer). All assays were performed in triplicate. In all cases, the assay volume was 0.5 ml and the radioligand depletion at the end of the experiments was less than 15% with the exception of the assays with [<sup>3</sup>H]-prazosin in the rat liver preparation (35%). Ideally, radioligand depletion should be seized to less than 10% (Hulme and Trevethick, 2010), so that we have to consider a possible technical limitation on the precision of the affinity estimation, at least for the data with [<sup>3</sup>H]-prazosin in the rat liver preparation, the assay used for labeling the off-target  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. Nevertheless, the  $\text{pK}_d$  value of [<sup>3</sup>H]-prazosin for  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors was 9.29 (0.51 nM), which was close to the value previously reported ( $\text{pK}_d$  9.98  $\pm$  0.27; Ohmura and Muramatsu, 1995).

For 5-HT<sub>1A</sub> receptor assays, 50  $\mu\text{g}$  membrane protein was incubated with LTDs ( $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M) in binding buffer containing 1 nM [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (agonist), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, and 10  $\mu\text{M}$  pargyline (for 15 minutes at 37°C) or 0.5 nM [<sup>3</sup>H]-p-MPPF (antagonist) and 1 mM GTP (for 45 minutes at 37°C). Nonspecific binding was determined in the presence of 10  $\mu\text{M}$  5-HT. The intrinsic activity of LTDs at 5-HT<sub>1A</sub> receptors was determined, as described by Assié et al. (1999), using the dissociation constants ( $K_i$ ) of the LTDs obtained for agonist (<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT) binding ( $K_{i\text{ High}}$ ) and for antagonist (<sup>3</sup>H]-p-MPPF) binding in the presence of a high concentration of GTP ( $K_{i\text{ Low}}$ ).  $K_{i\text{ Low}}/K_{i\text{ High}}$  values higher than 1.0 indicate agonism, values close to 1.0 suggest antagonism, and values lower than 1.0 indicate inverse agonism (Noël et al., 2014).

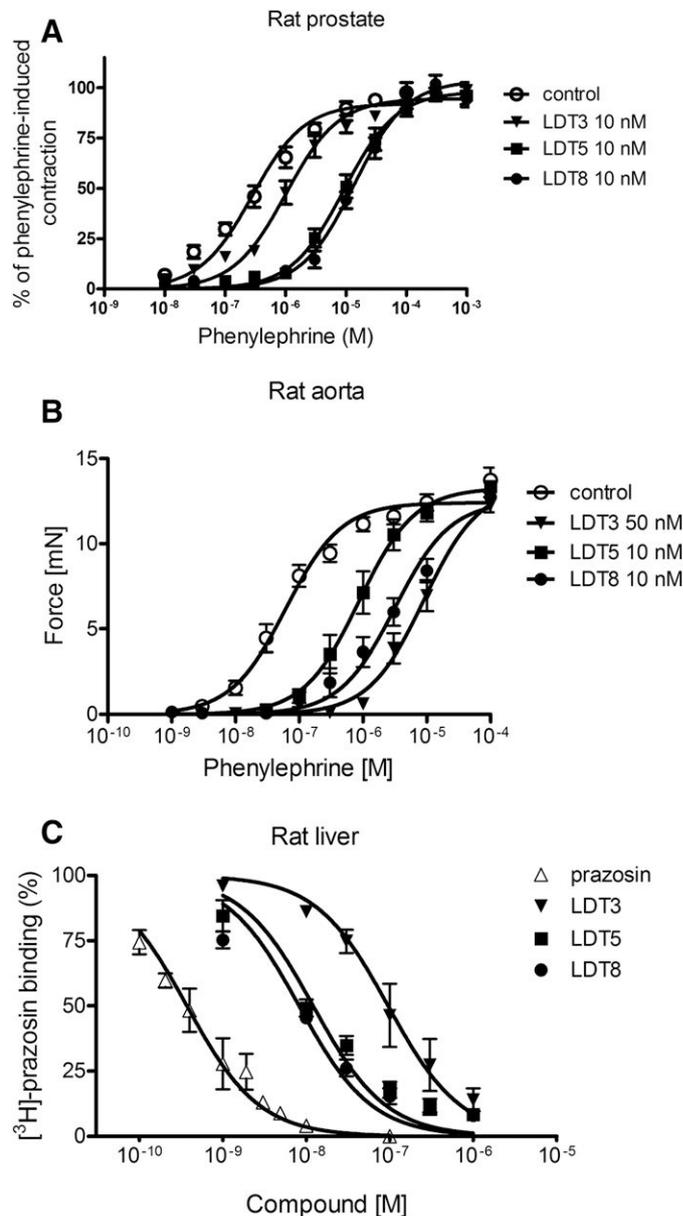
Rat livers ( $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors) were minced in ice-cold 5 mM Tris (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose and 1 mM EGTA, and then homogenized twice in 50 mM Tris HCl (pH 7.4) containing 100 mM NaCl and 2 mM EDTA (1:6, w/v), using an Ultra Turrax homogenizer. Liver homogenates were filtered through four layers of gauze and centrifuged at 5000 $g_{\text{max}}$ , for 20 minutes at 4°C. Supernatants were ultracentrifuged at 100,000 $g_{\text{max}}$ , for 60 minutes at 4°C, and final pellets were diluted in 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose (Michel et al., 1994). The protein content was determined, according to Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard. Then 150  $\mu\text{g}$  liver membrane protein was incubated with test compounds ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  M) and 0.1 nM [<sup>3</sup>H]-prazosin, in binding buffer containing 1 mM EDTA, for 45 minutes at 30°C. Nonspecific binding was defined in the presence of 1  $\mu\text{M}$  prazosin. Alternatively, saturation assays were performed using prazosin at concentrations ranging from 0.0001 to 0.1  $\mu\text{M}$  (Chagas-Silva et al., 2014).

The binding assays for the  $\alpha_2$ -adrenoceptors, 5-HT<sub>2A</sub>, and muscarinic receptors are described in Supplemental Material.

**Analysis of Binding Assays.** Data were analyzed by computerized nonlinear regression of untransformed data (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software), to estimate the  $\text{IC}_{50}$  of test compounds or radioligand  $K_d$  values. Dissociation constants ( $K_i$ ) were calculated using the Cheng and Prusoff equation (Cheng and Prusoff, 1973).

The  $K_d$  of [<sup>3</sup>H]-prazosin for  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors was 0.51 nM, the  $K_d$  of [<sup>3</sup>H]-RX821002 for  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors was 2.05 nM, and the  $K_d$  of [<sup>3</sup>H]-p-MPPF for 5-HT<sub>1A</sub> receptors was 0.86 nM (Chagas-Silva et al., 2014). The  $K_d$  values of [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT for 5-HT<sub>1A</sub> receptors (0.7 nM) and of [<sup>3</sup>H]-ketanserin for 5-HT<sub>2A</sub> receptors (1.7 nM) were previously estimated in our experimental conditions (Neves et al., 2010).

**Cell Growth Assays.** Human DU145 prostate cancer cells (75<sup>th</sup>–77<sup>th</sup> passage) and prostate cells from BPH patients (9<sup>th</sup>–11<sup>th</sup> passage; de Souza et al., 2011) were cultured in RPMI 1640 or DMEM,



**Fig. 1.** Effect of LTDs treatment on phenylephrine-induced contraction of rat prostate (A) and aorta (B), and on [<sup>3</sup>H]-prazosin binding to rat liver membranes (C). These tissues are enriched in the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes  $\alpha_{1A}$  (prostate),  $\alpha_{1D}$  (aorta), and  $\alpha_{1B}$  (liver). During isometric contraction assays mediated by  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, tissues were preincubated with test compounds for 60 minutes before stimulation with phenylephrine. Note that the error bars shown here represent the S.E.M. (instead of S.D.) of the means of 6–9 experiments using tissue samples from different animals. Competition-binding data represent averaged curves from three to five independent experiments performed in triplicate.

TABLE 2

Affinity of *N*-phenylpiperazine derivatives for native rat  $\alpha_{1D}$ - and  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors

Receptor	Compound	Control EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) [log EC <sub>50</sub> $\pm$ SD]	Treated EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) [log EC <sub>50</sub> $\pm$ SD]	log $K_B \pm$ SD (M)	$K_B$ (nM)	<i>n</i>
$\alpha_{1A}$	LDT3	0.24 [-6.62 $\pm$ 0.19]	1.2 [-5.92 $\pm$ 0.20]	-8.58 $\pm$ 0.23***	2.62	7
	LDT5	0.14 [-6.86 $\pm$ 0.27]	7.9 [-5.10 $\pm$ 0.37]	-9.74 $\pm$ 0.35	0.18	13
	LDT8	0.25 [-6.60 $\pm$ 0.24]	14.8 [-4.83 $\pm$ 0.27]	-9.76 $\pm$ 0.32	0.17	10
	LDT66 <sup>c</sup>	—	—	—	3.4 <sup>&amp;</sup>	—
	Tamsulosin <sup>a</sup>	—	—	-10.08 $\pm$ 0.04	0.08	3
	LDT3 <sup>b</sup>	0.15 [-6.87 $\pm$ 0.23]	3.55 [-5.45 $\pm$ 0.24]	-8.71 $\pm$ 0.10*	1.95	6
$\alpha_{1D}$	LDT5 <sup>c</sup>	0.08 [-7.12 $\pm$ 0.23]	1.34 [-5.87 $\pm$ 0.23]	-9.23 $\pm$ 0.08***	0.59	8
	LDT8 <sup>c</sup>	0.07 [-7.14 $\pm$ 0.09]	4.58 [-5.34 $\pm$ 0.14]	-9.75 $\pm$ 0.16***	0.18	9
	LDT66 <sup>c</sup>	—	—	—	2.18 <sup>&amp;</sup>	—
	BMY7378 <sup>a</sup>	—	—	-8.53 $\pm$ 0.13	3.03	5
	Tamsulosin <sup>a</sup>	—	—	9.99 $\pm$ 0.1	0.1	3

For  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors, the EC<sub>50</sub> and  $K_B$  values were estimated using isometric contraction assays of rat prostate stimulated with phenylephrine, in the absence or presence of 10 nM antagonist. Tamsulosin (10 nM) was used as control.

For  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, EC<sub>50</sub> and  $K_B$  values were estimated using isometric contraction assays of rat aorta stimulated with phenylephrine in the absence or presence of 50 nM (<sup>b</sup>), or 10 nM (<sup>c</sup>) antagonist. BMY7378 (10 nM) was used as a selective antagonist of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors.

Log  $K_B$  values were calculated individually.

F<sub>3,29</sub> = 27.10,  $P < 0.0001$  for  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors. \*\*\* $P < 0.001$  compared with tamsulosin (one-way ANOVA followed by a post hoc Dunnett's test).

F<sub>3,24</sub> = 169.7,  $P < 0.0001$  for  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with BMY7378 (one-way ANOVA followed by a post hoc Dunnett's test).

<sup>a</sup>Data from Chagas-Silva et al., 2014 used for comparison (with permission). <sup>&</sup>Calculated from pA<sub>2</sub> values by Schild regression of mean curves (Chagas-Silva et al., 2014) used for comparison (with permission).

respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% sodium pyruvate, and 1% penicillin/streptomycin (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), until confluence. For cell growth assays,  $5 \times 10^3$  or  $3 \times 10^3$  cells/well (for DU145 and BPH, respectively) were seeded in 96-well plates and cultured in serum-free medium for 24 h, and then incubated for 48 h in medium containing 2.5% fetal bovine serum and 1  $\mu$ M 5-HT or 3  $\mu$ M phenylephrine, in the absence or presence of LDTs, BMY7378, or *p*-MPPF (fresh medium with drugs was added at 24 h). Cell growth was evaluated by counting of viable cells using Trypan blue as an exclusion dye or by the MTT assay. Data were expressed as the percentage of the control condition (vehicle).

**Statistical Analysis.** Otherwise indicated, data are expressed as means and S.D. The significance of the differences among two or more conditions was determined by Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA), respectively. ANOVA was followed by post hoc Dunnett's or Newman-Keuls test. The *F* values calculated with the

software GraphPad Prism 5.0 for the ANOVA prior to post hoc tests are indicated in the legend of the tables and figures. Differences were considered statistically significant if  $P < 0.05$ .

## Results

**LDT3, LTD5, and LDT8 Have High Affinity for Native  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1D}$ -Adrenoceptors, but Not for Off-Target Receptors.** In assays using rat prostate, in which the subtype  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor is the most important for contraction (Hiraoka et al., 1999), our results indicate that LDT3, LDT5, and LDT8 have high affinity for  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors, with  $K_B$  values ranging from 0.17 to 2.62 nM (Fig. 1A; Table 2), close to those for the anti-BPH drug tamsulosin and slightly smaller than the previous derivative LDT66 (Table 2).

In rat aorta, in which the main  $\alpha_1$ -adrenoceptors responsible for contraction belong to the  $\alpha_{1D}$ -subtype (Hussain and Marshall, 1997), treatment with *N*-phenylpiperazine derivatives also induced a shift of the phenylephrine concentration-response curves to the right, suggesting a surmountable antagonism (Fig. 1B). All LDTs showed high affinity for  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, with  $K_B$  values in the low nanomolar range (Table 2), and the affinities of LDT5 and LDT8 for these receptors ( $K_B = 0.59$  and 0.18 nM, respectively) were significantly higher than that of the selective antagonist BMY7378 ( $K_B = 3$  nM; Table 2).

Analysis of the monophasic binding competition curves obtained with LDTs indicates that LDTs have lower affinity for  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors than prazosin (Fig. 1C), with mean  $K_i$  values ranging from 7 to 80 nM, compared with  $K_i = 0.3$  nM for prazosin ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ). Moreover, test compounds  $K_i$  values were also higher than their  $K_B$  values for  $\alpha_{1D}$ - and  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors ( $P < 0.05$ ). Indeed, LDT3 ( $K_i = 80$  nM,  $n = 4$ ), LDT5 ( $K_i = 10$  nM,  $n = 5$ ), and LDT8 ( $K_i = 7$  nM,  $n = 5$ ) had 17- to 41-fold less affinity for the  $\alpha_{1B}$ - than for the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (Table 2). In this experimental condition, tamsulosin showed a  $K_i$  value of 5.9 nM for  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors (Chagas-Silva et al., 2014), in agreement with previous reports (Williams et al., 1999; Pulito et al., 2000).

TABLE 3

Affinity of LDT3, LDT5, and LDT8 for rat 5-HT<sub>1A</sub> receptors

Compound	$K_i$ High, nM ( <i>n</i> ) [pK <sub>i</sub> $\pm$ SD]	$K_i$ Low, nM ( <i>n</i> ) [pK <sub>i</sub> $\pm$ SD]	$K_i$ Low/ $K_i$ High [95% C.I.]
LDT3	1.12 (4) [8.95 $\pm$ 0.07]***	1.73 (3) [8.76 $\pm$ 0.19]*	1.53 [1.02–2.81]
LDT5	2.51 (4) [8.60 $\pm$ 0.05]***	6.91 (3) [8.16 $\pm$ 0.13]***	2.75 [1.68–4.50]
LDT8	0.009 (2) [11.05 $\pm$ 0.03]	0.62 (3) [9.21 $\pm$ 0.07]	66.9 [45.0–99.8]
LDT66 <sup>a</sup>	5.9 (4) [8.23 $\pm$ 0.3]***	10.2 (4) [7.99 $\pm$ 0.1]***	1.71 [0.32–9.20]
5-HT <sup>a</sup>	3.02 (3) [8.52 $\pm$ 0.03]	213 (6) [6.67 $\pm$ 0.15]	76.8 [40.5–146]

$K_i$  values were determined in competition-binding assays with the agonist [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT ( $K_i$  High) or antagonist [<sup>3</sup>H]*p*-MPPF (in the presence of high GTP;  $K_i$  Low), using membrane preparations of rat hippocampus. pK<sub>i</sub> values (i.e.,  $-\log K_i$ ) were expressed as arithmetic means and S.D. of (*n*) experiments. The  $K_i$  Low/ $K_i$  High ratio is an estimate of the intrinsic activity toward 5-HT<sub>1A</sub> receptors, where values significantly higher than 1 indicate agonist activity (5-HT, was used as an example of full agonist), whereas values close to 1 indicate antagonist activity. The 95% confidence intervals (C.I.) of the  $K_i$  ratios were calculated as previously described (Noël et al., 2014).

F<sub>3,10</sub> = 1471,  $P < 0.0001$  for  $K_i$  High. \*\*\* $P < 0.001$  compared with LDT8 (one-way ANOVA for LDTs followed by a post hoc Dunnett's test).

F<sub>3,9</sub> = 55.97,  $P < 0.0001$  for  $K_i$  Low. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with LDT8 (one-way ANOVA for LDTs followed by a post hoc Dunnett's test).

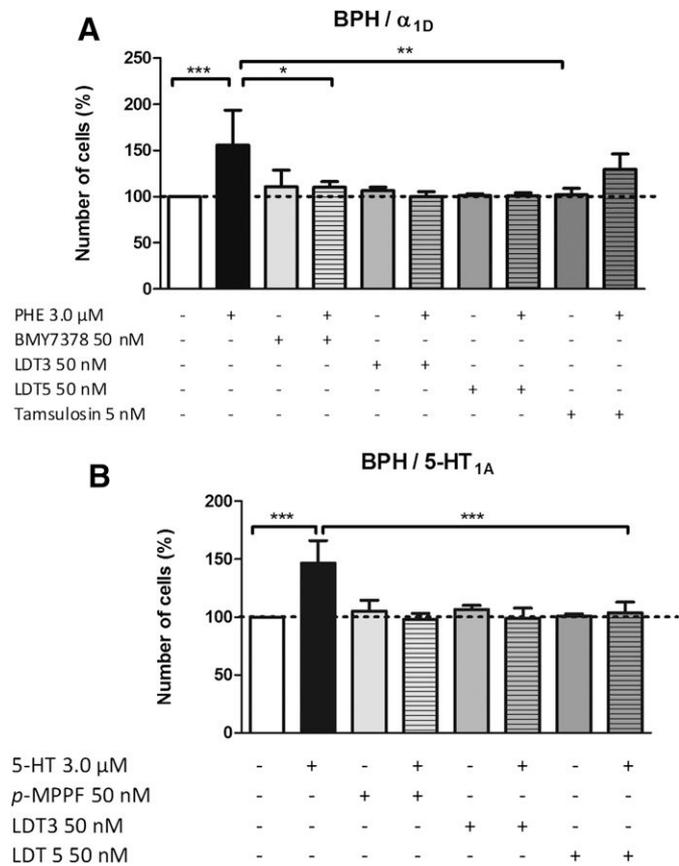
<sup>a</sup>Data from Chagas-Silva et al., 2014 with permission.

We also evaluated the affinity of LDT3, LDT5, and LDT8 for the BPH off-target  $\alpha_2$ -adrenoceptors and muscarinic receptors, using binding competition assays. LDTs showed  $K_i$  values in the micromolar range (0.2–108  $\mu\text{M}$ ), indicating a very low affinity for  $\alpha_2$ -adrenoceptors and muscarinic receptors (Supplemental Table 1).

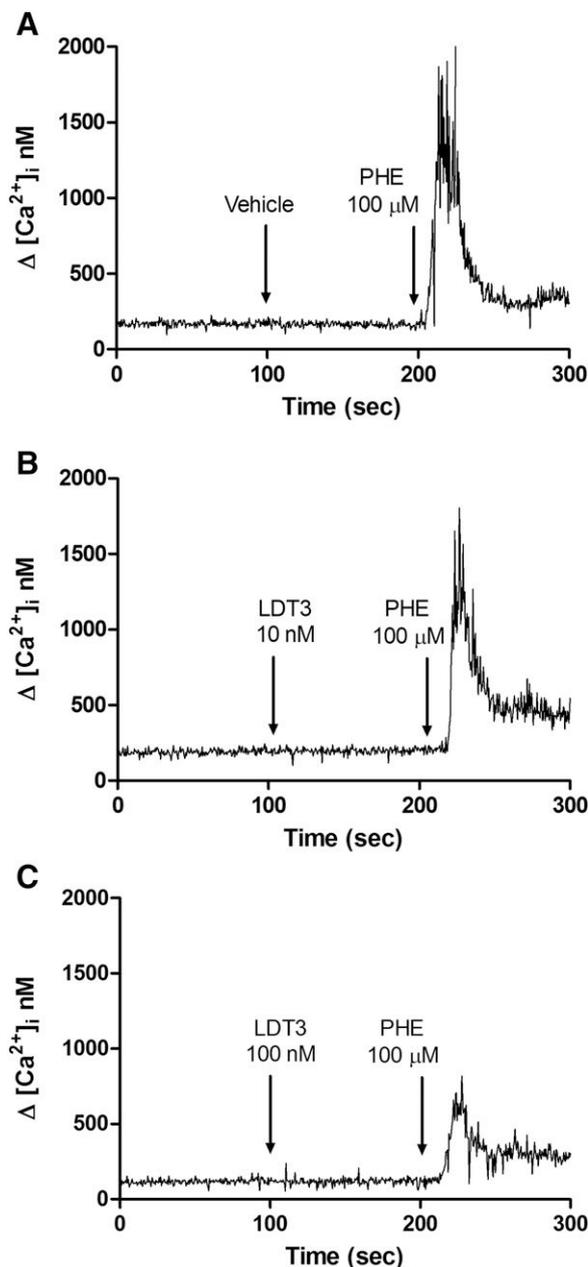
**LDT3 and LDT5 Are High-Affinity Antagonists of 5-HT<sub>1A</sub> Receptors, with Low-Affinity for the Off-Target 5-HT<sub>2A</sub>.** Competition-binding experiments revealed that all test compounds had high affinity for 5-HT<sub>1A</sub> receptors, with  $K_i$  values in the low nanomolar range for LDT3 and LDT5, and significantly lower for LDT8 ( $K_i = 9$  pM,  $P < 0.05$ ; Table 3). As the selectivity between 5-HT receptor subtypes is therapeutically relevant, we also measured the affinity of LDTs for the off-target 5-HT<sub>2A</sub> receptor. All three LDTs had lower affinity for 5-HT<sub>2A</sub> receptors ( $K_i = 70$ –389 nM) than for 5-HT<sub>1A</sub> receptors, and 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>1A</sub> ratios suggested high selectivity for 5-HT<sub>1A</sub> (60- to 44,000-fold; Supplemental Table 2).

We also determined the intrinsic activity of our compounds toward 5-HT<sub>1A</sub> receptors. For this purpose, we used the  $K_i$  ratio method, a functional binding assay that we recently

described and compared with two other methods (GTP-shift and [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding assay), for estimation of the intrinsic activity at the 5-HT<sub>1A</sub> receptor (Noël et al., 2014). Using the  $K_i$  ratio method, the full agonist 5-HT showed a  $K_i$  ratio of 76.8. The results in Table 3 suggest that LDT3 and LDT5 are 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists ( $K_i$  ratio close to unity), whereas LDT8 had a  $K_i$  ratio value compatible with a partial agonist. Because antagonism at the 5-HT<sub>1A</sub> receptor is supposed to be a prerequisite for efficacy of the type of multi-target BPH lead compound we aimed to develop, we interrupted the pharmacological characterization of LDT8 at this point.



**Fig. 2.** Inhibition of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor- and 5-HT<sub>1A</sub> receptor-dependent prostate cell growth by LDTs. Trypan blue exclusion assays were performed using prostate cells from BPH patients. BMY7378 (50 nM) and p-MPPF (50 nM, B) were used as selective antagonists of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (A) and 5-HT<sub>1A</sub> receptors (B), respectively. PHE, phenylephrine. The mean number of cells in the control condition (vehicle) was  $1.13 \times 10^5$  cells. Data were expressed as mean and S.D.  $n = 3$ –4 different cell cultures using cells from three donors. Assays performed in triplicates. (A)  $F_{9,28} = 5.086$ ,  $P = 0.0004$ . (B)  $F_{7,21} = 12.30$ ,  $P < 0.0001$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  versus the agonists (one-way ANOVA followed by the post hoc Dunnett's test).



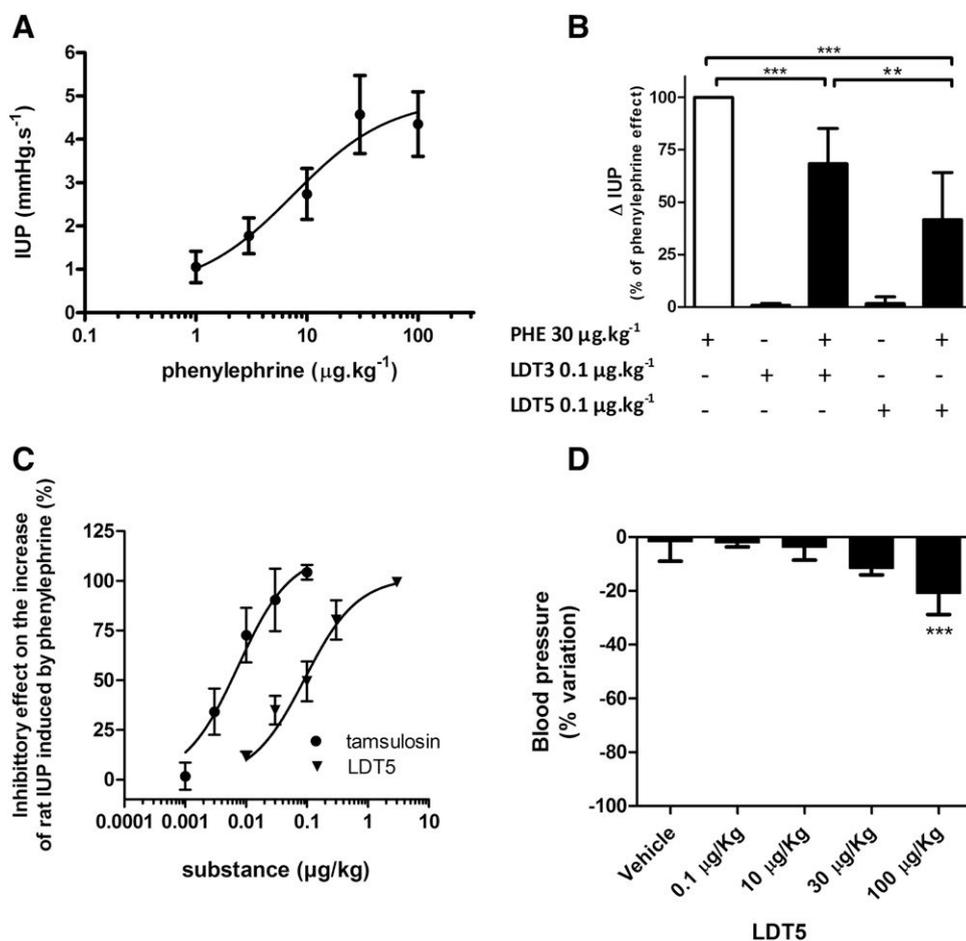
**Fig. 3.** Effect of LDT3 treatment on phenylephrine (PHE)-induced intracellular calcium elevation in Rat-1 fibroblasts transfected with the human  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor. The sharp increase in the intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) induced by 100  $\mu\text{M}$  PHE (A; vehicle) was attenuated by treatment with 10 and 100 nM LDT3 (B and C, respectively).

**LDT3 and LDT5 Inhibit the Proliferation of Prostate Cells from BPH Patients.** LDT3 and LDT5 behaved as high-affinity antagonists of rat  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Tables 2 and 3); thus, we decided to verify whether these compounds had antiproliferative activity against prostate cells from BPH patients. To induce prostate cell proliferation in vitro, we used 3  $\mu$ M of either phenylephrine or 5-HT, and the antagonists BMY7378 and *p*-MPPF (50 nM) were used as positive controls for  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub>-receptor inhibition, respectively. The LDT concentration used (50 nM) corresponded to ~30- to 50-fold the estimated in vitro affinity of these compounds for  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Counts of viable cells grown for 48 h in the presence of LTDs showed that both LDT3 and LDT5 inhibited BPH cell growth induced by phenylephrine and 5-HT, similarly to that observed for BMY7378 (Fig. 2A) and *p*-MPPF (Fig. 2B). We did not observe clear cytotoxic effects when LTDs were used alone (data not shown). Note that tamsulosin produced only partial inhibition of phenylephrine-induced growth at 5 nM (Fig. 2A), a concentration ~50-fold higher than the  $K_i$  we reported for the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (Table 2; Chagas-Silva et al., 2014). Similar effects of LTDs on BPH cells were obtained using the MTT assay ( $P < 0.001$ ; Supplemental Fig. 3).

In agreement with the results of cell proliferation assays using nontransformed BPH patient cells (Fig. 2), LDT3 and LDT5 also inhibited the 5-HT-stimulated growth of the prostate cancer cell line DU-145 (Supplemental Fig. 4).

Interestingly, LDT8 stimulated DU-145 cell growth (Supplemental Fig. 4), which is compatible with the partial 5-HT<sub>1A</sub> agonist activity detected for this compound in binding assays (Table 3).

**LDT3 and LDT5 Decrease Phenylephrine-Induced Calcium Elevation in Cells Overexpressing Human  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1D}$ -Adrenoceptors.** To confirm the antagonistic properties of LDT3 and LDT5 toward different human  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes, we used a functional assay based on  $[Ca^{2+}]_i$  elevation in Rat-1 cells overexpressing human  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1D}$ -, or  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors (Vázquez-Prado et al., 1997). In Rat-1 cells expressing  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, stimulation with 100  $\mu$ M phenylephrine typically induced a pronounced and transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  levels (Fig. 3A). In contrast, we observed a considerably less pronounced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  after phenylephrine stimulation in cells incubated with LDT3 (Fig. 3, B and C) or LDT5. For these  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, the mean  $pIC_{50}$  (and SD) values of LDT3 and LDT5 were  $8.5 \pm 0.67$  ( $n = 6$ ) and  $8.38 \pm 0.06$  ( $n = 4$ ), respectively (Supplemental Fig. 5). The  $pIC_{50}$  value of BMY7378 was  $8.53 \pm 0.08$  ( $n = 3$ ). LDT3 and LDT5 also had a high potency at  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors, with  $pIC_{50}$  values of  $7.53 \pm 0.37$  and  $7.16 \pm 0.51$ , respectively ( $n = 3$ ), which were smaller than for tamsulosin ( $8.36 \pm 0.33$ ,  $n = 3$ ,  $F_{2,6} = 6.718$ ,  $P = 0.0294$ ,  $P < 0.05$  one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test). In contrast, LDT3 and LDT5 had considerably lower affinity for  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, with  $pIC_{50}$  values for inhibition of  $[Ca^{2+}]_i$



**Fig. 4.** Effects of LDT3 and LDT5 on IUP modulation by phenylephrine (PHE). (A) Dose-response curve for the effect of PHE (i.v.) on rat IUP. The error bars shown here represent the S.E.M. (instead of S.D.) of the mean ( $n = 7$ ). (B) Effect of PHE (30  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup>) on IUP in the absence (white bar) or presence of pretreatment with a single dose of LDT3 or LDT5 (0.1  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup>, i.v.) (black bars). Data were expressed as mean and S.D.,  $n = 3-5$ .  $F_{4,20} = 64.82$ ,  $P < 0.0001$ . \*\*\* $P < 0.001$  versus PHE alone; \*\* $P < 0.01$  PHE after LDT3 versus PHE after LDT5 (ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test). (C) Dose-response curves of LDT5 ( $n = 4$ ) or tamsulosin ( $n = 3$ ) on IUP. The error bars shown here represent the S.E.M. (instead of S.D.) of the mean. (D) Effect of different doses of LDT5 on basal blood pressure. Data were expressed as mean and S.D.,  $n = 3-6$ .  $F_{4,19} = 10.97$ ,  $P < 0.0001$ . \*\*\* $P < 0.001$  versus vehicle (one-way ANOVA followed by the post hoc Dunnett's test).

elevation of  $6.10 \pm 0.29$  and  $5.88 \pm 0.34$  ( $n = 3$ ), respectively ( $P < 0.05$  versus  $\alpha_{1A}$ - and  $P < 0.001$  versus  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors). In this assay, the  $pIC_{50}$  value for tamsulosin was  $8.8 \pm 0.57$  ( $n = 4$ ). The overall ranking of potency of LDT3 and LDT5 at human  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes was  $\alpha_{1D} > \alpha_{1A} > \alpha_{1B}$  (LDT3:  $F_{2,9} = 19.41$ ,  $P = 0.0005$ ; LDT5:  $F_{2,6} = 37.08$ ,  $P = 0.0004$ ;  $P < 0.01$  one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls test).

**LDT3 and LDT5 Prevent Phenylephrine-Induced Increase in Intraurethral Pressure, and Do Not Affect Basal Blood Pressure.** As prostate contraction increases IUP (Akiyama et al., 1999), we investigated the effect of LDTs on rat IUP in vivo. Phenylephrine increased IUP in a dose-dependent manner, with an  $ED_{50}$  value of  $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Fig. 4A). Pretreatment with either LDT3 or LDT5 ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.v.) prevented the phenylephrine-induced increase in IUP ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and LDT5 was more effective than LDT3 (Fig. 4B). In higher doses, both compounds fully blocked the phenylephrine effect. The mean  $ED_{50}$  values of LDT3 and LDT5 (Fig. 4C),  $0.15$  and  $0.09 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively, were higher than the  $ED_{50}$  value of tamsulosin ( $0.007 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Considering that hypotension is a classic adverse effect of  $\alpha_1$ -antagonists, we evaluated the effect of LDT3 and LDT5 on rat basal blood pressure. We observed a small reduction in basal blood pressure after treatment with  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LDT3 and LDT5 (mean and S.D.:  $-2.92 \pm 2.6$  and  $-2.13 \pm 1.49\%$ , respectively;  $n = 6$ ), but this effect was not statistically different from that observed when saline was used as control ( $0.046 \pm 6.5\%$ ;  $n = 5$ ;  $P = 0.46$ ). In addition, we further explored the effect of higher doses of LDT5, and only the dose of  $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.v., reduced significantly the basal blood pressure (Fig. 4D).

## Discussion

Randomized controlled clinical trials have shown that blockage of prostatic  $\alpha_1$ -adrenoceptor is the most effective pharmacological management for relieving LUTS/BPH. For instance, both short- and long-term studies have shown that this pharmacological class improves the symptoms and the urinary flow rate (Lepor et al., 1996; Kirby et al., 2003; McConnell et al., 2003; Chapple, 2005). However,  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor or uroselective  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists show better tolerability (Chapple, 2005; McVary et al., 2011; Oelke et al., 2013). Nevertheless, some patients may be unresponsive to  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor blockade (Kaplan, 2006), which limits the efficacy of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonists; in such cases, the risk of acute urinary retention is not reduced (McVary et al., 2011). The improvement of LUTS/BPH mediated by the association of 5- $\alpha$  reductase inhibitors with  $\alpha_1$ -adrenoceptor blockers as compared with monotherapy with  $\alpha_1$ -adrenoceptor blockers is only clearly observed after long-term therapy, whereas some adverse effects of 5- $\alpha$  reductase inhibitors may reduce patient compliance to treatment (McConnell et al., 2003; Chapple, 2005; Nickel, 2006; Tarle et al., 2009; Oelke et al., 2013). In this study, we show that the *N*-phenylpiperazine derivatives LDT3 and LDT5 inhibit rat prostate muscle contraction in vivo and human hyperplastic prostate cell growth in vitro.

Some diseases, including BPH, are multifactorial (Roehrborn, 2008), most likely requiring multi-target strategies to improve therapeutic efficacy (Morphy et al., 2004; Lu et al., 2012). For the clinical management of BPH, we hypothesized

that targeting of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1A</sub> receptors, in addition to  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonism, could be particularly interesting because both receptors stimulate prostate cell growth (Dizeyi et al., 2004; Kojima et al., 2009a),  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors mRNA expression is increased in BPH (Kojima et al., 2009a), and nonprostatic  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors may contribute to bladder overactivity (Malloy et al., 1998; Michel, 2010; Kurizaki et al., 2011).

The  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor mediates human (Forray et al., 1994) and rat (Hiraoka et al., 1999) prostatic contraction (Michel and Vrydag, 2006). LDT3, LDT5, and LDT8 had high affinity for  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors in functional assays (Table 2). The affinities of LDT5 and LDT8 for rat  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors were similar to that of the clinically used anti-BPH agent tamsulosin (Table 2; Noble et al., 1997), and higher than the previous derivative LDT66.

Aside from their high affinity for rat and human  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, LDT3 and LDT5 also have low affinity for the off-target  $\alpha_{1B}$  subtype, in both species.  $\alpha_1$ -Adrenoceptor blockers are considered similar in efficacy to reduce LUTS/BPH, but they differ in tolerability (Michel, 2010; Kim et al., 2014). For instance, silodosin may be adequate to BPH patients receiving antihypertensive treatment (as this drug has little impact on blood pressure), whereas alfuzosin may be suitable for sexually active patients (as silodosin has the highest risk of ejaculatory dysfunction) (Chapple, 2005; Kim et al., 2014). Because human vascular expression of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors increases in aging (Rudner et al., 1999), the low affinity of LDT3 and LDT5 for this receptor subtype may also reduce the risk of hypotension, a classic adverse effect of therapy with  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists (Jelski and Speakman, 2012). Moreover, some data suggest that tamsulosin could be more prone to induce high-grade intraoperative floppy iris syndrome (McVary et al., 2011; Chang et al., 2014).

Despite the fact that rat prostate does not surround urethra, it contributes to the increase of the IUP (Akiyama et al., 1999). Data from in vivo assays indicated clearly that LDT3 and LDT5 blocked the increase in rat IUP induced by phenylephrine (Fig. 4B), and LDT5 has an  $ED_{50}$  value of  $0.09 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Fig. 4C). In the same model, a similar dose of the previous derivative LDT66 ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.v.) was about 20% less effective than LDT5 (data not shown). Therefore, our results suggest that LDT3 and LDT5 are capable of relaxing rat prostate. If translated to human prostate, we hypothesize that they could inhibit the dynamic component of BPH. Furthermore, we also showed that a similar dose of LDT3 and LDT5 ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) did not affect rat basal blood pressure, which suggests uroselectivity at least for LDT5. Based on our results, it is possible that LDT5, in the doses used to reduce LUTS, would be neutral in relation to blood pressure.

The role of G protein-coupled receptors in cell growth has been investigated (revised in Liebmann, 2011). Keffel and colleagues (2000) showed in Chinese hamster ovary cells that the stimulation of transfected human  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor increases cell growth and extracellular signal-regulated kinase signaling. Moreover, it was shown that receptor stimulation induces proliferation of smooth muscle cells and fibroblasts from the adventitia of rat aorta, and the mechanism involved epidermal growth factor receptor transactivation (Zhang et al., 2004). In vivo, chronic stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors induces rat prostatic hyperplasia involving transforming growth factor- $\beta$  signaling (Kim et al., 2009). Actually,

transforming growth factor- $\beta$  signaling has been considered as one of the mechanisms that contribute to human prostate enlargement (Descazeaud et al., 2011).

$\alpha_{1D}$ -Adrenoceptor mRNA have been shown in human hyperplastic prostate samples (Nasu et al., 1996; Kojima et al., 2006, 2009a; Morelli et al., 2014). Naftopidil, which has 3 and 17 times higher affinity for human  $\alpha_{1D}$ - than for  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, respectively (Takei et al., 1999), reduces prostate cell growth by arresting cell cycle at G<sub>1</sub> phase (Kojima et al., 2009a,b). However, the presence of prostatic  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor at protein level is still controversial, which warrants further investigation (Michel and Vrydag, 2006; Kojima et al., 2009b).

LDT3 and LDT5 inhibited the phenylephrine-induced growth of prostate cells from BPH patients (Fig. 2; Supplemental Fig. 3), and of DU-145 prostate cancer cells in a way qualitatively similar to BMY7378, which suggests the role of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (Supplemental Fig. 4). In our model, although LDT66 blocked the phenylephrine effect (DU-145) ( $P < 0.01$ ), it also caused a slight proliferative effect when used alone (Chagas-Silva et al., 2014). Other  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists with a quinazoline moiety also inhibit prostate cell growth in vitro; however, this effect is independent of  $\alpha_1$ -adrenoceptor and involves anoikis in prostate cells mediated by death receptors (revised in Kyprianou et al., 2009). Therefore, the mechanism of action involved in the antigrowth effect of the present *N*-phenylpiperazine derivatives, LDT3 and LDT5, depends on the blockage of the agonist action and differs from the effect of quinazoline drugs.

Another important signaling molecule that stimulates prostate cell growth is 5-HT, which is synthesized by neuroendocrine cells (Abrahamsson et al., 1986). 5-HT<sub>1A</sub> receptors stimulate the growth of some cell types such as fibroblasts (Abdel-Baset et al., 1992). Benign and malignant prostate tissues express 5-HT<sub>1A</sub> receptors, and mounting evidence suggests that these receptors stimulate prostate cell growth via Akt/mitogen-activated protein kinase pathway (Abdul et al., 1994; Dizeyi et al., 2004, 2011). Based on binding assays, LDT3 and LDT5 have high affinity for 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Table 3). Importantly, LDT3 and LDT5 showed higher affinity for 5-HT<sub>1A</sub> receptors than LDT66 (Chagas-Silva et al., 2014) and naftopidil, another *N*-phenylpiperazine compound ( $K_i = 107$  nM; Borbe et al., 1991).

LDT3 and LDT5 also inhibited the 5-HT-induced BPH (and DU-145) cell growth in a similar manner to that of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist *p*-MPPF (Fig. 2; Supplemental Fig. 3), in agreement with the antiproliferative effect of another 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist (NAN 190) toward prostate cancer PC3 and DU-145 cell lines (Dizeyi et al., 2004). Moreover, whereas LDT3 and LDT5 blocked completely the agonist effect, LDT66 showed a partial inhibition (Chagas-Silva et al., 2014). In contrast, LDT8 behaved as a partial agonist of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, in both binding and functional (cell growth) assays; thus, we discontinued the pharmacological testing of LDT8 for the purposes of multi-targeted anti-BPH therapy development.

Our data confirm that the *N*1-(2-methoxyphenyl)-*N*4-piperazine scaffold confers affinity for  $\alpha_1$ -adrenoceptors, as well as for 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Glennon et al., 1988; Leopoldo et al., 2004; Chagas-Silva et al., 2014), and unveils the multi-target antagonist behavior of the *N*-phenylpiperazine derivatives described in this work. In addition, LDT5 showed higher

affinity for  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, and 5-HT<sub>1A</sub> receptors than the previous derivative LDT66, which has a hexyl substitution in the *N*<sub>4</sub>-phenylpiperazine moiety (Chagas-Silva et al., 2014), and therefore, this compound showed an improved pharmacological profile at target receptors. This could suggest that the phenethyl auxophoric subunit present in LDT3 and LDT5 (R<sub>1</sub>, Table 1), and absent in LDT66, is important for the interaction with amino acid residues in the before-mentioned receptors.

Also of note, the three LDTs tested in this study showed low affinity for off-target receptors, including  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors, as well as 5-HT<sub>2A</sub> and muscarinic receptors. Therefore, our data suggest that LDT3 and LDT5 are unlikely to cause the adverse effects associated with inhibition of important off-target receptors. We were also able to discard any interference of LDT3 and LDT5 (1  $\mu$ M) with hERG K<sup>+</sup> channel function (data not shown), whose blockade can elicit potentially fatal cardiac arrhythmias (Priest et al., 2008), which is the reason why this test is absolutely required for new drug approval by regulatory authorities (Bowes et al., 2012; Peters 2013).

Based on clinical data, current selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists used to manage LUTS/BPH do not shrink prostate (McConnell et al., 2003; Kojima et al., 2009b). Overall, our results showed that LDT3 and LDT5 inhibit human hyperplastic prostate cell growth in vitro, while also relaxing prostate muscle, most probably by the multi-target antagonism of  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Therefore, our working hypothesis is that the multi-target mechanism of action of the *N*-phenylpiperazine derivatives LDT3 and LDT5 could modify the course of the disease. If successfully translated to the clinic, these two important effects of LDTs could putatively modify the course of the disease by slowing prostate enlargement, and also alleviating LUTS/BPH. Thus, we propose that LDT3 and LDT5 are potential new lead compounds that could be of value for BPH treatment.

#### Acknowledgments

The authors thank Orlando R. Moreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil) for technical assistance. Claudia L. M. Silva, Luiz E. Nasciutti, Luiz A. S. Romeiro, and François Noël are senior fellows of National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil).

#### Authorship Contributions

*Participated in research design:* Silva, Noël, Romeiro, García-Sáinz.

*Conducted experiments:* Nascimento-Viana, Carvalho, Alcántara-Hernández, Chagas-Silva.

*Contributed new reagents or analytic tools:* Nasciutti, Souza.

*Performed data analysis:* Nascimento-Viana, Silva, Noël.

*Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* Silva, Noël.

#### References

- Abdel-Baset H, Bozovic V, Szyf M, and Albert PR (1992) Conditional transformation mediated via a pertussis toxin-sensitive receptor signalling pathway. *Mol Endocrinol* **6**:730–740.
- Abdul M, Anezinis PE, Logothetis CJ, and Hoosein NM (1994) Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. *Anticancer Res* **14**: 1215–1220.
- Abrahamsson PA, Wadström LB, Alumets J, Falkmer S, and Grimelius L (1986) Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. *Pathol Res Pract* **181**:675–683.
- Akiyama K, Hora M, Tatemichi S, Masuda N, Nakamura S, Yamagishi R, and Kitazawa M (1999) KMD-3213, a uroselective and long-acting  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist, tested in a novel rat model. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:81–91.

- Assié MB, Cosi C, and Koek W (1999) Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT<sub>1A</sub> receptors and intrinsic activity. *Eur J Pharmacol* **386**:97–103.
- Barendrecht MM, Frazier EP, Vrydag W, Alewijnse AE, Peters SLM, and Michel MC (2009) The effect of bladder outlet obstruction on  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptor expression and function. *Neurourol Urodyn* **28**:349–355.
- Böhmer T, Pfeiffer N, and Gericke A (2014) Three commercial antibodies against  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes lack specificity in paraffin-embedded sections of murine tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **387**:703–706.
- Borbe HO, Metzner P, and Szelenyi I (1991) 5-HT<sub>1A</sub>-agonistic properties of naftopidil, a novel antihypertensive drug. *Eur J Pharmacol* **205**:105–107.
- Bowes J, Brown AJ, Hamon J, Jarolimek W, Sridhar A, Waldron G, and Whitebread S (2012) Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat Rev Drug Discov* **11**:909–922.
- Chagas-Silva F, Nascimento-Viana JB, Romeiro LA, Barberato LC, Noël F, and Silva CL (2014) 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. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **387**:225–234.
- Chang DF, Campbell JR, Colin J, and Schweitzer C; Study Surgeon Group (2014) Prospective masked comparison of intraoperative floppy iris syndrome severity with tamsulosin versus alfuzosin. *Ophthalmology* **121**:829–834.
- Chapple CR (2005) A comparison of varying  $\alpha$ -blockers and other pharmacotherapy options for lower urinary tract symptoms. *Rev Urol* **7** (Suppl 4):S22–S30.
- Cheng Y and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</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.
- Descazeaux A, Weinbreck N, Robert G, Vacherot F, Abbou CC, Labrousse F, Allory Y, Rubin MA, and de la Taille A (2011) Transforming growth factor  $\beta$ -receptor II protein expression in benign prostatic hyperplasia is associated with prostate volume and inflammation. *BJU Int* **108**:E23–E28.
- Dizeyi N, Bjartell A, Nilsson E, Hansson J, Gadaleanu V, Cross N, and Abrahamsson PA (2004) Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *Prostate* **59**:328–336.
- Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzl M, Austild-Taskén K, and Abrahamsson PA (2011) Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* **29**:436–445.
- Fiorino F, Severino B, Magli E, Ciano A, Caliendo G, Santagada V, Frecentese F, and Perissutti E (2014) 5-HT<sub>1A</sub> receptor: an old target as a new attractive tool in drug discovery from central nervous system to cancer. *J Med Chem* **57**:4407–4426.
- Forray C, Bard JA, Wetzel JM, Chiu G, Shapiro E, Tang R, Lepor H, Hartig PR, Weinschenk RL, and Branchek TA, et al. (1994) The alpha 1-adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate: the pharmacological properties of the cloned human alpha 1c subtype. *Mol Pharmacol* **45**:703–708.
- Glennon RA, Naiman NA, Lyon RA, and Titeler M (1988) Arylpiperazine derivatives as high-affinity 5-HT<sub>1A</sub> serotonin ligands. *J Med Chem* **31**:1968–1971.
- Gryniewicz G, Poenie M, and Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**:3440–3450.
- Hampel C, Dolber PC, Smith MP, Savic SL, Throff JW, Thor KB, and Schwinn DA (2002) Modulation of bladder alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor subtype expression by bladder outlet obstruction. *J Urol* **167**:1513–1521.
- Hieble JP (2011) Animal models for benign prostatic hyperplasia. *Handbook Exp Pharmacol* **202**:69–79.
- Hiraoka Y, Ohmura T, Oshita M, Watanabe Y, Morikawa K, Nagata O, Kato H, Taniguchi T, and Muramatsu I (1999) Binding and functional characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in the rat prostate. *Eur J Pharmacol* **366**:119–126.
- Hsiung SC, Tamir H, Franke TF, and Liu KP (2005) Roles of extracellular signal-regulated kinase and Akt signaling in coordinating nuclear transcription factor-kappaB-dependent cell survival after serotonin 1A receptor activation. *J Neurochem* **95**:1653–1666.
- Hulme EC and Trevethick MA (2010) Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol* **161**:1219–1237.
- Hussain MB and Marshall I (1997) Characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* **122**:849–858.
- Jelski J and Speakman M (2012) Alpha adrenoceptor antagonists—have we reached the optimum balance of safety/efficacy? *Drug Discov Today: Therapeutic Strategies* **9**(1):e27–e33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddstr.2012.03.002>
- Kaplan SA (2006) Update on the American Urological Association guidelines for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol* **8** (Suppl 4):S10–S17.
- Keffel S, Alexandrov A, Goepel M, and Michel M (2000) alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor subtypes differentially couple to growth promotion and inhibition in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:906–911.
- Kenakin T (1993) Competitive antagonism, in *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction* (Kenakin T ed) pp 278–322, Raven Press, New York.
- Kim J, Yanagihara Y, Kikugawa T, Ji M, Tanji N, Masayoshi Y, and Freeman MR (2009) A signaling network in phenylephrine-induced benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology* **150**:3576–3583.
- Kim TN, Nam JK, Lee KS, Kim TH, Park SW, Shin DG, Park HJ, Lee W, Lee ZZ, and Chung MK (2014) Reasons for prescription change of  $\alpha_1$ -blockers in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia. *Urology* **84**:427–432.
- Kirby RS, Roehrborn C, Boyle P, Bartsch G, Jardin A, Cary MM, Sweeney M, and Grossman EB; Prospective European Doxazosin and Combination Therapy Study Investigators (2003) Efficacy and tolerability of doxazosin and finasteride, alone or in combination, in treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia: the Prospective European Doxazosin and Combination Therapy (PREDICT) trial. *Urology* **61**:119–126.
- Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, Tsujimoto G, and Kohri K (2009b) Subtypes of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. *Nat Clin Pract Urol* **6**:44–53.
- Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Koshimizu TA, Hayashi Y, Kuniwa M, Tsujimoto G, and Kohri K (2009a) Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **69**:1521–1528.
- Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayashi Y, Tsujimoto G, and Kohri K (2006) Quantification of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor subtypes by real-time RT-PCR and correlation with age and prostate volume in benign prostatic hyperplasia patients. *Prostate* **66**:761–767.
- Kurizaki Y, Ishizuka O, Imamura T, Ichino M, Ogawa T, Igawa Y, Nishizawa O, and Andersson KE (2011) Relation between expression of  $\alpha_1$ (1)-adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. *Scand J Urol Nephrol* **45**:15–19.
- Kyprianou N, Vaughan TB, and Michel MC (2009) Apoptosis induction by doxazosin and other quinazoline  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists: a new mechanism for cancer treatment? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **380**:473–477.
- Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Contino M, Lacivita E, Perrone R, and Tortorella V (2004) Studies on 1-arylpiperazine derivatives with affinity for rat 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Pharm Pharmacol* **56**:247–255.
- Lepor H, Williford WO, Barry MJ, Brawer MK, Dixon CM, Gormley G, Haakenson C, Machi M, Narayan P, and Padley RJ; Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study Group (1996) The efficacy of terazosin, finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* **335**:533–539.
- Liebmann C (2011) EGF receptor activation by GPCRs: a universal pathway reveals different versions. *Mol Cell Endocrinol* **331**:222–231.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275.
- Lu J-J, Pan W, Hu Y-J, and Wang Y-T (2012) Multi-target drugs: the trend of drug research and development. *PLoS One* **7**:e40262.
- Malloy BJ, Price DT, Price RR, Bienstock AM, Dole MK, Funk BL, Rudner XL, Richardson CD, Donatucci CF, and Schwinn DA (1998) Alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. *J Urol* **160**:937–943.
- McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GL, Jr, Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, McVary KT, Nyberg LM, Jr, and Clarke HS, et al. Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Research Group (2003) The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* **349**:2387–2398.
- McVary KT, Roehrborn CG, Avins AL, Barry MJ, Bruskewitz RC, Donnell RF, Foster HE, Jr, Gonzalez CM, Kaplan SA, and Penson DF, et al. (2011) Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* **185**:1793–1803.
- Michel MC (2010) The forefront for novel therapeutic agents based on the pathophysiology of lower urinary tract dysfunction:  $\alpha$ -blockers in the treatment of male voiding dysfunction: how do they work and why do they differ in tolerability? *J Pharmacol Sci* **112**:151–157.
- Michel MC, Hanft G, and Gross G (1994) Radioligand binding studies of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br J Pharmacol* **111**:533–538.
- Michel MC and Vrydag W (2006)  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - and  $\beta$ -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* **147** (Suppl 2):S88–S119.
- Morelli MB, Amantini C, Nabissi M, Liberati S, Cardinali C, Farfariello V, Tomassoni D, Quaglia W, Piergentili A, and Bonifazi A, et al. (2014) Cross-talk between alpha<sub>1D</sub>-adrenoceptors and transient receptor potential vanilloid type 1 triggers prostate cancer cell proliferation. *BMC Cancer* **14**:921.
- Morphy R, Kay C, and Rankovic Z (2004) From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today* **9**:641–651.
- Nasu K, Moriyama N, Kawabe K, Tsujimoto G, Murai M, Tanaka T, and Yano J (1996) Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. *Br J Pharmacol* **119**:797–803.
- Neves G, Menegatti R, Antonio CB, Graziottin LR, Vieira RO, Rates SMK, Noël F, Barreiro EJ, and Fraga CA (2010) Searching for multi-target antipsychotics: discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D<sub>2</sub>-like and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Bioorg Med Chem* **18**:1925–1935.
- Nickel JC (2003) Benign prostatic hyperplasia: does prostate size matter? *Rev Urol* **5** (Suppl 4):S12–S17.
- Nickel JC (2006) BPH: costs and treatment outcomes. *Am J Manag Care* **12**:S141–S148.
- Noble AJ, Chess-Williams R, Couldwell C, Furukawa K, Uchiyama T, Korstanje C, and Chapple CR (1997) The effects of tamsulosin, a high affinity antagonist at functional alpha 1A- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* **120**:231–238.
- Noël F, Pompeu TE, and Moura BC (2014) Functional binding assays for estimation of the intrinsic efficacy of ligands at the 5-HT<sub>1A</sub> receptor: application for screening drug candidates. *J Pharmacol Toxicol Methods* **70**:12–18.
- Oelke M, Bachmann A, Descazeaux A, Emberton M, Gravas S, Michel MC, N'dow J, Nordling J, and de la Rosette JJ; European Association of Urology (2013) EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *Eur Urol* **64**:118–140.
- Ohmura T and Muramatsu I (1995) Two distinct  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in rabbit liver: a binding study. *Br J Pharmacol* **116**:2591–2596.
- Perabco FG (2012) Drug development for LUTS: the challenge for industry. *Drug Discov Today: Therapeutic Strategies* **9**(1):e5–e14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddstr.2012.02.001>
- Peters JU (2013) Polypharmacology: foe or friend? *J Med Chem* **56**:8955–8971.
- Pradidarchep W, Stallen J, Labryère WT, Dabhoiwala NF, Michel MC, and Lamers WH (2009) Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinic and adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**:397–402.

- Price DT, Schwinn DA, Lomasney JW, Allen LF, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1993) Identification, quantification, and localization of mRNA for three distinct  $\alpha_1$  adrenergic receptor subtypes in human prostate. *J Urol* **150**:546–551.
- Priest BT, Bell IM, and Garcia ML (2008) Role of hERG potassium channel assays in drug development. *Channels* **2**:87–93.
- Pulito VL, Li X, Varga SS, Mulcahy LS, Clark KS, Halbert SA, Reitz AB, Murray WV, and Jolliffe LK (2000) An investigation of the uroselective properties of four novel  $\alpha_1$ (1a)-adrenergic receptor subtype-selective antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:224–229.
- Roehrborn CG (2008) Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int J Impot Res* **20** (Suppl 3):S11–S18.
- Romeiro LA, da Silva Ferreira M, da Silva LL, Castro HC, Miranda AL, Silva CL, Noël F, Nascimento JB, Araújo CV, and Tibiriçá E, et al. (2011) Discovery of LASSBio-772, a 1,3-benzodioxole N-phenylpiperazine derivative with potent  $\alpha_1$ A/D-adrenergic receptor blocking properties. *Eur J Med Chem* **46**:3000–3012.
- Rudner XL, Berkowitz DE, Booth JV, Funk BL, Cozart KL, D'Amico EB, El-Moalem H, Page SO, Richardson CD, and Winters B, et al. (1999) Subtype specific regulation of human vascular  $\alpha_1$ -adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* **100**:2336–2343.
- Sciarrà A, Mariotti G, Salciccia S, Autran Gomez A, Monti S, Toscano V, and Di Silverio F (2008) Prostate growth and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**:254–260.
- de Souza PA, Palumbo A, Jr, Alves LM, de Souza VP, Cabral LM, Fernandes PD, Takiya CM, Menezes FS, and Nasciutti LE (2011) Effects of a nanocomposite containing *Orbignya speciosa* lipophilic extract on benign prostatic hyperplasia. *J Ethnopharmacol* **135**:135–146.
- Takei R, Ikegaki I, Shibata K, Tsujimoto G, and Asano T (1999) Naftopidil, a novel  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist, displays selective inhibition of canine prostatic pressure and high affinity binding to cloned human  $\alpha_1$ -adrenoceptors. *Jpn J Pharmacol* **79**:447–454.
- Tarle M, Spajic B, Kraljic I, and Kusic Z (2009) Continuous finasteride therapy for benign prostate hypertrophy upgrades both neuroendocrine differentiation and aggressive prostate cancer. *Anticancer Res* **29**:1797–1801.
- Tseng-Crank J, Kost T, Goetz A, Hazum S, Roberson KM, Haizlip J, Godinot N, Robertson CN, and Saussy D (1995) The  $\alpha_{1C}$ -adrenoceptor in human prostate: cloning, functional expression, and localization to specific prostatic cell types. *Br J Pharmacol* **115**:1475–1485.
- Vázquez-Prado J, Medina LC, and García-Sáinz JA (1997) Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of  $\alpha_1$ b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* **272**:27330–27337.
- Williams TJ, Blue DR, Daniels DV, Davis B, Elworthy T, Gever JR, Kava MS, Morgans D, Padilla F, and Tassa S, et al. (1999) In vitro  $\alpha_1$ -adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel  $\alpha_1$ A-adrenoceptor selective antagonists. *Br J Pharmacol* **127**:252–258.
- Zhang H, Chalothorn D, Jackson LF, Lee DC, and Faber JE (2004) Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle. *Circ Res* **95**:989–997.

---

**Address correspondence to:** Dr. Claudia Lucia Martins Silva, Laboratory of Molecular and Biochemical Pharmacology, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho, 373, room J-17, 21941-599, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: silva.claudiamartins.ufrj@gmail.com, cmartins@farmaco.ufrj.br

---