



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO,
ATIVIDADE FÍSICA E PLASTICIDADE FENOTÍPICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sidiane Barros da Silva

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE NOVOS COMPOSTOS
CONTENDO O ANEL DE PIRIMIDINONA SOBRE OS RECEPTORES α_1 -
ADRENÉRGICOS

Vitória de Santo Antão
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO,
ATIVIDADE FÍSICA E PLASTICIDADE FENOTÍPICA



Sidiane Barros da Silva

Avaliação da atividade antagonista de novos compostos contendo o anel de pirimidinona sobre os receptores α_1 -adrenérgicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Alice Valença Araújo

**Vitória de Santo Antão
2022**

Catálogo na Fonte
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB-4/2005

S586a Silva, Sidiane Barros da.

Avaliação da atividade antagonista de novos compostos contendo o anel de pirimidinona sobre os receptores α 1-adrenérgicos/ Sidiane Barros da Silva - Vitória de Santo Antão, 2022.

51 f.; il.

Orientadora: Alice Valença Araújo.

Dissertação (Mestrado em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2022.

Inclui referências e anexo.

1. Hipertensão. 2. Hiperplasia Prostática. 3. Pirimidinonas. I. Araújo, Alice Valença (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23. ed.)

BIBCAV/UFPE - 0010/2022

SIDIANE BARROS DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE NOVOS COMPOSTOS CONTENDO O ANEL DE PIRIMIDINONA SOBRE OS RECEPTORES A1-ADRENÉRGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bases Experimentais e Clínicas da Plasticidade Fenotípica

Aprovada em: 18/02/2022

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Valença Araújo
Universidade Federal de Pernambuco**

BANCA EXAMINADORA:

**Prof.^a Dr.^a Alice Valença Araújo
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira
Universidade Federal de Pernambuco**

**Participação por Videoconferência
Prof. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco**

Dedico este trabalho ao meu querido esposo, Lucas Chalegre da Silva, por todo cuidado, carinho, paciência e parceria e à minha querida mãe, Joseane Vila Nova de Barros, por todo amor e dedicação da sua vida para com a minha.

AGRADECIMENTOS

Muitas vezes o caminho parece estar muito difícil, mas quando contamos com pessoas que estão dispostas a nos ajudar ele se torna menos árduo. Para concluir essa importante etapa na minha vida contei com a ajuda de muitas pessoas, uma delas é a minha orientadora Dra. Alice Valença que durante 3 anos de iniciação científica e agora 2 anos de mestrado me orientou com muita paciência, dedicação e responsabilidade, aspectos que levarei para a toda minha vida.

Gostaria de agradecer àqueles que contribuíram diretamente para este projeto. À Profª Dra. Janaína Versiani dos Anjos e ao seu aluno de doutorado, Sidney Gustavo, do Departamento de Química Fundamental da UFPE, que nos forneceu os compostos. Também gostaria de expressar minha gratidão à Profª Dra. Rita Tostes e a Profª Dra. Simone Potje e ao seu aluno de mestrado Daniel Rodrigues pela parceria no ensaio de citotoxicidade, ambos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Também externo a minha gratidão à minha parceira de experimentos Sílvia Maria que durante esses últimos 5 anos sempre esteve comigo me acompanhando nos experimentos e também a Ruth Albuquerque, aluna de iniciação científica, que sempre esteve pronta a nos ajudar. Também agradeço aos coordenadores do PPGNAFPF que mesmo enfrentando esse período difícil de pandemia eles tiveram a preocupação de tornar esse momento menos difícil.

Além disso, não poderia deixar de expressar a minha gratidão à toda minha família, em especial ao meu querido esposo que sempre me incentivou e me apoiou em toda essa jornada. Também agradeço a minha maravilhosa mãe por todo o investimento estudantil, se cheguei onde estou foi por meio dela. Gratidão às minhas lindas irmãs, Talita, Rute e Raquel, aos meus queridos cunhados e ao meu lindo sobrinho, minha alegria.

Não poderia esquecer de agradecer àquele que foi o mais importante em toda minha trajetória e que sempre se mostrou fiel a cumprir Suas promessas em meu viver, ao meu bom e eterno Deus. “Porque Dele e por Ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém. Rm 11:36”.

RESUMO

Os receptores α_1 -adrenérgicos estão distribuídos amplamente pelo organismo. Os antagonistas destes receptores são utilizados para tratar condições como a hipertensão arterial sistêmica, hiperplasia benigna de próstata e urolitíase. Embora esta classe de fármacos seja bastante tolerável, as drogas apresentam pouca seletividade, outras possuem um tempo curto de meia-vida e algumas induzem apoptose em determinados tecidos. Assim, é relevante a busca por novos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a ação de novos compostos contendo o anel de pirimidinona sobre os receptores α_1 -adrenérgicos e verificar seus possíveis efeitos citotóxicos. Para avaliar a citotoxicidade dos compostos, foi realizado o ensaio MTT nas linhagens celulares HUVEC e A7r5. Para avaliar o efeito dos compostos sobre a reatividade vascular, os anéis de artéria aorta sem endotélio de ratos foram montados no banho de órgãos. Em seguida, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para a fenilefrina na presença e ausência dos compostos STICL, STICL-Prop, STICL-Acet, STICL-Et e SATICL ou da prazosina, (100 $\mu\text{mol/L}$) um antagonista α_1 -adrenérgico utilizado como controle positivo. A partir das curvas concentração-efeito obtidas, foram calculados o Efeito Máximo e o pEC_{50} . A fim de caracterizar um dos compostos, foram utilizados os ductos deferentes de ratos, que foram montados no banho de órgãos e submetidos a alguns estímulos com noradrenalina, na presença ou ausência de concentrações crescentes de STICL-Et ou prazosina, para posterior cálculo da pIC_{50} . Na avaliação da citotoxicidade na linhagem celular HUVEC, a viabilidade variou entre 86,8 - 100%, enquanto que em células A7r5 variou entre 72,6 - 111,9%, o que demonstra que todos os compostos podem ser considerados não citotóxicos nas condições avaliadas. O maior percentual de viabilidade celular nas células A7r5 foi com a exposição do STICL-Et (111,9%). Após avaliação dos compostos em artéria aorta, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, apenas o composto STICL-Et foi capaz de reduzir o Efeito Máximo da contração induzida pela fenilefrina (Controle: $E_{\text{max}}=2,28 \pm 0,14$ g e $\text{pEC}_{50}= 7,60 \pm 0,21$, $n=8$; Prazosina: $E_{\text{max}}=0.10 \pm 0.10$ g, $n=2$, $p<0,05$; STICL-Et: $E_{\text{max}}=0.12 \pm 0.09^*$ g, $n=5$, $p<0,05$). Em ducto deferente, o STICL-Et ($\text{pIC}_{50}= 4,6 \pm 0,12$) apresentou uma menor potência que a prazosina ($\text{pIC}_{50}= 8,2 \pm 0,18$) e foi capaz de abolir a ação da noradrenalina na concentração de 300 $\mu\text{mol/L}$. Diante disso, os novos compostos com o anel de pirimidinona não apresentaram citotoxicidade nas condições avaliadas e pode-se sugerir que o composto STICL-Et pode ser um antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos, uma vez que foi capaz de reduzir a contração induzida pela fenilefrina na aorta de rato e abolir a contração induzida pela noradrenalina no ducto deferente de rato, embora com uma potência menor que a da prazosina. Assim, o STICL-Et é bastante promissor, podendo tornar-se um candidato à fármaco.

Palavras-chave: antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos; hipertensão arterial sistêmica, hiperplasia benigna de próstata; pirimidinonas.

ABSTRACT

The α_1 -adrenergic receptors are widely distributed throughout the body and are used to treat conditions such as systemic arterial hypertension, benign prostate hyperplasia and urolithiasis. Although this class of drugs is quite tolerable, the drugs have little selectivity, others present a short half-life and some induce apoptosis in certain tissues. Thus, the search for new antagonists of α_1 -adrenergic receptors is relevant. Therefore, we aimed to characterize the action of new compounds containing the pyrimidinone ring on α_1 adrenergic receptors and verify their possible cytotoxic effects. To evaluate the cytotoxicity of the compounds, the MTT assay was performed on HUVEC and A7r5 cell lineages. To assess the effect of the compounds on vascular reactivity, endothelium-denuded aortic rings from rats were mounted in the organ bath and cumulative concentration-effect curves for phenylephrine were performed in the presence and absence of the new compounds STICL, STICL-Prop, STICL-Acet, STICL-Et and SATICL or prazosin (100 $\mu\text{mol/L}$), an α_1 -adrenergic antagonist used as a positive control. From the concentration-effect curves obtained, the Maximum Effect (ME) and pEC_{50} were calculated. In order to characterize one of the compounds (STICL-ET), the vas deferens of rats were mounted in the organ bath and subjected to some stimuli with noradrenaline, in the presence or absence of increasing concentrations of STICL-Et or prazosin, for later calculation of the pIC_{50} . In the evaluation of cytotoxicity in the HUVEC cell line, the viability ranged between 86.8 - 100%, while in A7r5 cells, between 72.6 - 111.9%, which demonstrates that all compounds can be considered non-cytotoxic under the conditions evaluated. The highest viability percentage in A7r5 cells was for STICL-Et (111.9%). In the aorta, at a concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$, only the STICL-Et compound was able to reduce the Maximum Effect of phenylephrine-induced contraction (Control: $\text{ME}=2.28 \pm 0.14$ g and $\text{pEC}_{50}= 7.60 \pm 0.21$, $n=8$; Prazosin: $\text{ME}=0.10 \pm 0.10$ g, $n=2$, $p<0.05$; STICL-Et: $\text{ME}=0.12 \pm 0.09^*$ g, $n=5$, $p<0.05$). In the vas deferens, STICL-Et ($\text{pIC}_{50}= 4.6 \pm 0.12$) showed a lower potency than prazosin ($\text{pIC}_{50}= 8.2 \pm 0.18$) and was able to abolish the action of noradrenaline at a concentration of 300 $\mu\text{mol/L}$. Therefore, the new compounds with the pyrimidinone ring did not show cytotoxicity under the conditions evaluated and it may be suggested that STICL-Et may be an antagonist of α_1 adrenergic receptors, since it was able to reduce the contraction induced by phenylephrine in aorta and the contraction induced by noradrenalin in vas deferens, despite the lower potency than prazosin. Thus, STICL-Et is very promising and could become a drug candidate.

Key-words: α_1 -adrenergic receptor antagonists; systemic arterial hypertension, benign prostatic hyperplasia; pyrimidinones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação esquemática da sinalização dependente da proteína Gq clássica, desencadeada pelos subtipos de receptores α_1 . A subunidade α se dissocia da β e γ , após ativação do receptor α_1 -adrenérgico, e ativa a PLC que por sua vez cliva o PIP2 em DAG e IP_3 . O IP_3 se liga aos seus receptores na membrana do retículo endoplasmático promovendo a liberação de Ca^{2+} no citoplasma. 19
- Figura 2.** Série 5 a-k das tiometil-pirimidinonas. 24
- Figura 3.** Estrutura química dos novos compostos pirimidinônicos: a) STICL, b) STICL-Et, c) STICL-Prop, d) STICL-Acet, e) SATICL. 25
- Figura 4.** Viabilidade celular (%) de HUVEC pelo ensaio MTT após 30 min de tratamento com os compostos STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet e SATICL, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. As barras representam a porcentagem de viabilidade celular de 4 experimentos. 33
- Figura 5.** Viabilidade celular (%) de células A7r5 pelo ensaio MTT após 30 min de tratamento com os compostos STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet e SATICL, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. As barras representam a porcentagem de viabilidade celular de 4 experimentos. 34
- Figura 6.** Efeito dos compostos tiometil-pirimidinônicos sobre a contração induzida pela fenilefrina em aorta torácica de ratos. As curvas representam a resposta contrátil induzida pela fenilefrina na ausência e presença dos compostos STICL, STICL-Et, STIC-Prop, STICL-Acet, SATICL (100 $\mu\text{mol/L}$) ou do antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (Prazosina, 100 $\mu\text{mol/L}$), em anéis sem endotélio. Os pontos representam média \pm erro padrão da média 2-8 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * Diferença estatística em relação ao controle(fenilefrina). (ANOVA de uma via, seguida de Newmann-Keuls). 35
- Figura 7.** Efeito do STICL-Et sobre a contração induzida pela noradrenalina sobre o ducto deferente de ratos. As curvas representam a resposta contrátil induzida pela noradrenalina na presença de concentrações crescentes de STICL-Et (100 $\mu\text{mol/L}$). Os pontos represent média \pm erro padrão da média de 7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. 36
- Figura 8.** Efeito da prazosina sobre a contração induzida pela noradrenalina sobre o ducto deferente de ratos. As curvas representam a resposta contrátil induzida pela noradrenalina na presença de concentrações crescentes de prazosina. Os pontos

representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos realizados em
preparações de diferentes animais.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão de RNAm para os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos em diferentes tecidos de ratos	18
Tabela 2. Antagonistas seletivos para os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos ..	20
Tabela 3. Contração induzida pela fenilefrina em aorta torácica de ratos na ausência ou na presença dos compostos tiometil-pirimidinônicos (100 $\mu\text{mol/L}$) ou do antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (Prazosina, 100 $\mu\text{mol/L}$).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A7r5	Células do músculo liso vascular de a. aorta torácica de embrião de rato
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de Variância
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAV	Centro Acadêmico da Vitória
CO ₂	Gás Carbônico
DAG	Diacilglicerol
DD	Ducto Deferente
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DMSO	DimetilSulfóxido
EC ₅₀	Concentração em que o fármaco produz 50% de sua resposta máxima
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)
E _{max}	Efeito máximo
EPM	Erro Padrão da Média
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
g	Gramas
GPCR	<i>G-protein coupled Receptors</i> (Receptores Acoplados à Proteína G)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica

HBP	Hiperplasia Benigna de Próstata
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Células endoteliais de veia do cordão umbilical humano)
IP ₃	Inositol Trifosfato
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L	Litro
Min	Minuto
mmol	Milimol
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitros
RNA _m	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il] -2,5-difeniltetrazólio
μmol	Micromol
μg	Micrograma
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monossódico
nmol	Nanomol
O ₂	Oxigênio
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
PBS	Tampão fosfato-salina
pEC ₅₀	Logaritmo negativo da EC ₅₀
pH	Potencial hidrogeniônico

Phe	Phenylephrine (Fenilefrina)
pIC ₅₀	Logaritmo negativo da concentração do antagonista que reduz em 50% o efeito máximo do agonista
PLC	Phospholipase C (Fosfolipase C)
U	Unidade
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Receptores α_1-adrenérgicos	18
2.2 Antagonistas dos receptores α_1-adrenérgicos e sua relevância clínica	20
2.2.1 <i>Antagonistas α_1-adrenérgicos</i>	20
2.2.2 <i>Hipertensão arterial sistêmica (HAS)</i>	20
2.2.3 <i>Hiperplasia benigna de próstata (HBP)</i>	21
2.3 Pirimidinonas e compostos contendo o anel de pirimidinona	22
2.3.1 <i>Pirimidinonas: compostos dotados de grande atividade biológica</i>	22
2.3.2 <i>Síntese multicomponente de compostos contendo o anel de pirimidinona</i>	23
.....	25
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivos específicos	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 Obtenção dos compostos	28
5.2 Animais	28
5.3 Ensaio de citotoxicidade	28
5.4 Experimentos funcionais	29
5.4.1 <i>Preparação da artéria aorta</i>	29
5.4.2 <i>Avaliação do efeito dos compostos em artéria aorta</i>	30
5.4.3 <i>Preparação do ducto deferente</i>	30
5.4.4 <i>Protocolos para caracterização do composto</i>	31
5.5 Análise Estatística	31
6 RESULTADOS	33
6.1 Ensaio de citotoxicidade	33
6.2 Experimentos funcionais	34
6.2.1 <i>Avaliação do efeito dos compostos em artéria aorta de ratos</i>	34
6.2.2 <i>Determinação da pIC50 em ducto deferente de ratos</i>	36
7 DISCUSSÃO	38

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Uso Animal	50

1 INTRODUÇÃO

Os receptores adrenérgicos fazem parte da superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), e estes incluem 3 subfamílias: α_1 , α_2 e β -adrenérgicos (AHLQUIST, 1948; LANGER, 1974; STARKE *et al.*, 1974; LANDS *et al.*, 1967). Os receptores α_1 -adrenérgicos se subdividem em α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} (MCGRATH, 1982). Estes três subtipos têm afinidade semelhante pela adrenalina e pela noradrenalina (HWA, GRAHAM; PEREZ, 1995).

Os subtipos dos receptores α_1 -adrenérgicos estão distribuídos amplamente pelo corpo, principalmente, no sistema cardiovascular e no trato genitourinário (TESTA *et al.*, 1993; LACHNIT *et al.* 1997; MALLOY *et al.* 1998; SIGALA *et al.* 2004; MARTI *et al.*, 2005). No sistema cardiovascular, os subtipos dos receptores α_1 -adrenérgicos participam da regulação da pressão arterial (PIASCIK, 1990, ROKOSH e SIMPSON, 2002; MARTÍNEZ-SALAS *et al.*, 2011). Nos vasos sanguíneos, quando são ativados, ocorre uma cascata que culmina no aumento da concentração de cálcio citoplasmático, o que leva à vasoconstrição e, assim, ao aumento da pressão arterial (HWA; GRAHAM; PEREZ, 1995). Já no músculo liso do trato genitourinário, o aumento de cálcio leva a uma contração deste (CAINE *et al.*, 1975; LEPOR *et al.*, 1988; GOSLING; CHILTON *apud* MALLOY *et al.*, 1998). Portanto, para o tratamento de condições nas quais se deseja o relaxamento do músculo liso nestes sistemas, são utilizados os antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos (BEACH; MAURO 2006; STEARNS; SANDHU, 2015; BELAYNEH; KOROWNYK, 2016).

Os antagonistas α_1 -adrenérgicos foram indicados primeiramente como anti-hipertensivos (HAYES *et al.*, 1974; DE MEY; VANHOUTTE, 1981). Atualmente, além desta indicação, esta classe é indicada como primeira linha para hiperplasia benigna de próstata (HBP) e outros sintomas associados a distúrbios do trato urinário (BELAYNEH; KOROWNYK, 2016; STEARNS; SANDHU, 2015; BEACH; MAURO 2006).

Embora se tenha um bom número de drogas antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos e elas sejam clinicamente bem toleradas, elas apresentam baixa seletividade para os subtipos de receptores, especialmente *in vivo*, o que pode levar a efeitos indesejáveis (KUBACKA *et al.*, 2013). Além disso, os antagonistas podem ocasionar apoptose em determinados tecidos como na próstata e cardiomiócitos, por

uma via independente do receptor α_1 e devido à quinazolina presente na estrutura dessas drogas (GONZÁLEZ-JUANATEY *et al.*; KYPRIANOU, 2003; 2003; EIRAS *et al.*, 2006). Assim, surge a importância da busca por novos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos e, portanto, temos buscado caracterizar um novo antagonista dos adrenoreceptores- α_1 à base de pirimidinona.

As pirimidinonas são derivados oxigenados das pirimidinas, compostos dotados de grande atividade biológica (BROWN; MASON, 1962). Esta classe de heterocíclicos apresenta uma similaridade estrutural com um anti-hipertensivo da classe dos antagonistas adrenérgicos, a prazosina, o que leva à hipótese de que eles poderiam apresentar esta atividade (BERNHART *et al.* 1994).

Nosso grupo de pesquisa, juntamente com a equipe do Departamento de Química Fundamental CCEN/UFPE, há alguns anos, tem se dedicado à síntese e à descoberta de novos candidatos a fármacos que contém o núcleo pirimidinona em suas estruturas (MENDONÇA JUNIOR *et al.*, 2005; FALCÃO *et al.*, 2006; DOS ANJOS *et al.*, 2012). Sendo assim, algumas séries de pirimidinonas foram sintetizadas por meio de uma estratégia multicomponente, nunca antes registrada na literatura. Algumas destas moléculas foram capazes de inibir a contração induzida pela fenilefrina (um agonista seletivo α_1) em anéis de artéria aorta de ratos, o que sugere uma ação antagonista sobre os receptores α_1 -adrenérgicos (ANDRADE *et al.*, 2017).

Até o presente momento, foram sintetizados duas séries de compostos pirimidínicos. A primeira série foram as tiometil-pirimidinonas e a segunda as 2-morfolino-pirimidinonas, tendo a primeira apresentado resultados mais promissores.

Por meio de estudos de relação estrutura-atividade, foi possível observar quais alterações potencializavam ou não a ação sobre os receptores α_1 -adrenérgicos. Desta forma, novas modificações químicas foram propostas contendo o chassi molecular tiometilpirimidinônico, em que foram obtidos os novos compostos contendo o anel de pirimidinona. Neste trabalho, as ações desses novos compostos sobre os receptores α_1 -adrenérgicos foi estudada em artéria aorta e ducto deferente de ratos, bem como a citotoxicidade dos mesmos em duas linhagens celulares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Receptores α_1 -adrenérgicos

Os receptores acoplados a proteína G (GPCR) são alvos farmacológicos de suma importância para descoberta de novas drogas, tanto que 40% de todas as drogas atualmente no mercado atuam nestes receptores (PUPO, *et al.* 2016). Dentro dessa superfamília, são encontrados os adrenoreceptores, receptores para as catecolaminas adrenalina e noradrenalina, que são estudados há quase 100 anos (AHLQUIST, 1948).

Segundo suas especificidades de ligação, os adrenoreceptores inicialmente foram divididos em α e β (AHLQUIST, 1948). Posteriormente, foram subdivididos em α_1 e α_2 (LANGER, 1974; STARKE *et al.*, 1974) e em β_1 , β_2 e β_3 (LANDS *et al.*, 1967).

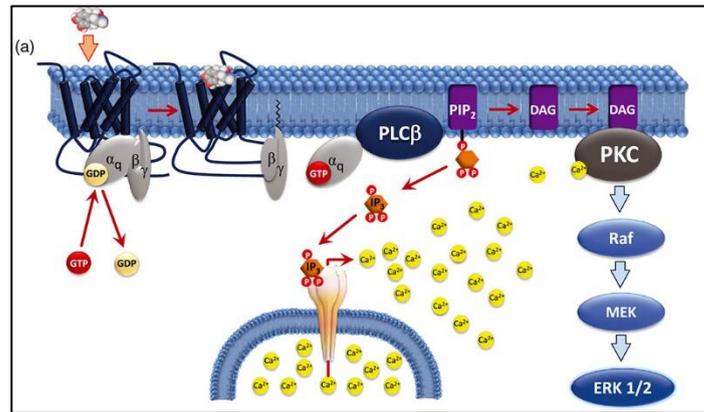
Os receptores α_1 - adrenérgicos apresentam três subtipos, o α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} (DU e LI, 2000). Esses subtipos de receptores são encontrados em diferentes órgãos. A Expressão de RNAm para os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos para diferentes tecidos são mostradas na Tabela 1 (ROKOSH *et al.*, 1994; SCOFIELD *et al.*, 1995).

Tabela 1. Expressão de RNAm para os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos em diferentes tecidos de ratos

α_{1A} -adrenérgico	α_{1B} -adrenérgico	α_{1D} -adrenérgico
Coração, cérebro, aorta, veia cava, ducto deferente, estômago, intestino delgado, cólon, próstata, córtex cerebral, glândula submaxilar, pulmão e rim.	Coração, cérebro, aorta, veia cava, ducto deferente, pulmão, baço, fígado e glândula adrenal.	Coração, cérebro, aorta, veia cava, ducto deferente, pulmão e baço.

Os três subtipos dos receptores α_1 - adrenérgicos são acoplados à proteína $G_{q/11}$ e, quando ativados, ativa-se a proteína $G_{q/11}$, que, por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) levando à produção dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e IP_3 . Estes segundos mensageiros induzem o aumento da concentração de cálcio citoplasmático, resultando, em células de músculo liso, numa contração muscular (Figura 1) (HWA; GRAHAM; PEREZ, 1995).

Figura 1. Representação esquemática da sinalização dependente da proteína Gq clássica, desencadeada pelos subtipos de receptores α_1 . A subunidade α se dissocia da β e γ , após ativação do receptor α_1 -adrenérgico, e ativa a PLC que por sua vez cliva o PIP₂ em DAG e e IP₃. O IP₃ se liga aos seus receptores na membrana do retículo endoplasmático promovendo a liberação de Ca²⁺ no citoplasma.



Fonte: (AKINAGA, GARCÍA-SÁINZ e PUPO, 2019).

Os três subtipos dos receptores α_1 -adrenérgicos estão expressos nos vasos sanguíneos, no entanto, pode haver predominância de um subtipo, dependendo da veia, artéria ou até mesmo da porção do vaso sanguíneo estudado (PIASCNIK *et al.*, 1995; GÓMEZ-ZAMUDIO *et al.*, 2002; KAMIKIHARA *et al.*, 2005). Quando são ativados nos vasos sanguíneos, o aumento de cálcio intracelular promove uma vasoconstrição, aumentando a resistência vascular periférica e assim elevando a pressão arterial. Portanto, os três subtipos participam do controle da pressão arterial (PIASCNIK, 1990, ROKOSH e SIMPSOM, 2002; MARTÍNEZ-SALAS *et al.*, 2011), no entanto o α_{1A} parece ter um papel principal, uma vez que ao utilizar o antagonista seletivo de α_{1A} SZL-49 foi observada uma redução da pressão sanguínea em ratos, enquanto que ao ser utilizado o agonista seletivo α_{1A} A61603 em artéria mesentérica de camundongos a potência deste foi bem maior quando comparada a fenilefrina (PIASCNIK, 1990; MARTÍNEZ-SALAS, *et al.* 2007; DALY *et al.*, 2002).

Os receptores α_1 -adrenérgicos também são importantes no sistema geniturinário. Eles estão presentes na bexiga (MALLOY *et al.* 1998, SIGALA *et al.* 2004), ureter (MORITA *et al.*, 1994; SIGALA *et al.* 2004), próstata (NASU *et al.*, 1996; WALDEN *et al.*, 1997; NISHI *et al.*, 1998.), ducto deferente (BURT *et al.*, 1995) e uretra (TESTA *et al.*, 1993), levando à contração do músculo liso nesses tecidos e participando do controle urinário (CAINE *et al.*, 1975; LEPOR *et al.*, 1988).

2.2 Antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos e sua relevância clínica

2.2.1 Antagonistas α_1 -adrenérgicos

O primeiro antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos clinicamente usado foi a prazosina (HAYES *et al.*, 1974). Apesar da sua alta seletividade para os adrenoceptores α_1 , em concentrações mais altas (acima de 100 nmol/L), a prazosina também se liga aos receptores α_2 (HO *et al.*, 1998 *apud* DOCHERTY, 2019).

A terazosina é um congênere da prazosina e, devido à presença de um anel furano saturado, sua farmacocinética é diferente, apresentando um efeito de longa duração (FRISHMAN *et al.*, 1998). Outro congênere da prazosina é a doxazosina (KENNY *et al.*, 1995; QUARESMA *et al.*, 2019).

Além destes antagonistas não seletivos, são encontrados outros com seletividade para cada subtipo de receptor α_1 (Tabela 2) (KENNY *et al.*, 1995; GIARDINÀ *et al.*, 1995; PATANE *et al.*, 1998; TATEMICHI *et al.*, 2006; QUARESMA *et al.*, 2019; PROUDMAN, PUPO e BAKER, 2020; PUPO e BAKER, 2020).

Tabela 2. Antagonistas seletivos para os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos

Antagonistas α_{1A} -	Antagonistas α_{1B}	Antagonistas α_{1D}
5-metilurapidil	Alfuzosina	Alfuzosina
RS 100329	Ciclazosina	BMY7378
Silodosina	L-765.314	Tamsulosina
Tamsulosina		WB 4101
WB 4101		

2.2.2 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

O primeiro uso clínico dos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos foi para a HAS, condição clínica caracterizada por um aumento persistente da pressão arterial (BARROSO, *et al.* 2020). A HAS é vista como um dos mais importantes problemas de saúde pública. No Brasil, de acordo com dados do Vigitel, a HAS atingiu cerca de 24,7% da população adulta em 2018 (VIGITEL, 2019).

Mesmo diante do grande número de fármacos anti-hipertensivos existentes, boa parte da população não mantém os níveis pressóricos controlados (KONIG *et al.*, 2018; GUS *et al.*, 2004; NELSON *et al.*, 2011, NOGUERA *et al.*, 2010). Diante disso, é bastante importante a busca por novos fármacos mais seletivos para os subtipos, com maior eficácia e que ocasionem menos efeitos adversos.

O mecanismo de ação dos antagonistas que leva ao efeito anti-hipertensivo se baseia no fato de que os mesmos, ao antagonizarem o receptor α_1 -adrenérgico presente nos vasos sanguíneos, impedem a vasoconstrição, levando à redução da resistência vascular periférica e, portanto, à redução da pressão arterial. Apesar dessa classe de fármacos não ser a primeira escolha para o controle pressórico, eles são bastantes eficazes e toleráveis, mas devido à farmacocinética desfavorável e baixa seletividade, eles ocasionam efeitos adversos como tontura, dor de cabeça, astenia e hipotensão postural (KUBACKA *et al.*, 2013). Uma vantagem adicional de alguns destes antagonistas, como a prazosina, terazosina e doxazosina, é que podem melhorar o perfil lipídico dos pacientes (ZANCHETTI, 1984; DEGER, 1986; GRIMM JR *et al.*, 1996).

2.2.3 Hiperplasia benigna de próstata (HBP)

Os antagonistas dos adrenoreceptores- α_1 também são usados para o tratamento da HBP, uma condição na qual há um crescimento adenomatoso não-maligno da glândula periuretral da próstata (WOODARD *et al.*, 2016). Com o aumento prostático, a bexiga e a uretra são pressionadas, e assim o fluxo urinário é obstruído. Com a obstrução do fluxo urinário, há um esvaziamento incompleto da bexiga e retenção urinária, correlacionados com o surgimento de infecções recorrentes, urgência urinária e noctúria (BERRY *et al.*, 1984; LEPOR, 2005), gerando um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos.

Na HBP, a hiperplasia está principalmente no tecido muscular (BARTSCH *et al.*, 1979; SHAPIRO *et al.*, 1992). Quase metade da pressão uretral neste aumento prostático (40%) surge do tônus adrenérgico (FURUYA *et al.*, 1982). Assim, os antagonistas- α_1 aliviam os sintomas de HBP e são considerados o tratamento de primeira linha para esta condição (BELAYNEH e KOROWNYK, 2016; STEARNS e SANDHU, 2015; YUAN *et al.*, 2013).

Alguns antagonistas dos adrenoreceptores- α_1 , como a terazosina e

doxazosina, também podem estar associados à apoptose das células musculares lisas da próstata, um caminho que é independente dos receptores α_1 e provavelmente devido ao anel quinazolina (KYPRIANOU, 2003; CHON, *et al.*, 1999) o que é benéfico para a HPB. No entanto, essa apoptose não tem sido relatada apenas na próstata mas também em cardiomiócitos (GONZÁLEZ-JUANATEY *et al.*, 2003; EIRAS *et al.*, 2006) desfavorecendo a ação desses compostos. Sendo assim, também é importante a síntese de novos compostos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos que não sejam à base de quinazolina.

Ainda, no trato urinário, a tamsulosina, a terazosina e a doxazosina por promoverem um relaxamento dos ureteres, provaram ser opções seguras e eficazes para a urolitíase (BEACH e MAURO 2006; HOLLINGSWORTH *et al.*, 2006).

A prevalência de HBP, bem como a da HAS, aumenta com a idade (WOODARD *et al.*, 2016). Desse modo, é bastante comum indivíduos com as duas condições. O mecanismo em comum da fisiopatologia da HAS e HBP pode ser uma estratégia para simplificar o esquema terapêutico e reduzir o custo (STEERS e KIRBY, 2005; BOYLE e NAPALCOV, 1995), o que aumenta a adesão e o sucesso do tratamento. Assim, torna-se importante a busca por fármacos que podem ser utilizados para ambas as condições.

2.3 Pirimidinonas e compostos contendo o anel de pirimidinona

2.3.1 Pirimidinonas: compostos dotados de grande atividade biológica

Devido à grande variedade e complexidade estrutural, diversos compostos heterocíclicos são conhecidos e muitos tem se destacado na química teórica e aplicada (COSTA, 2004). Estes compostos apresentam em sua composição química sistemas de anéis, contendo frequentemente átomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre (MENDONÇA JUNIOR, 2003).

Os compostos heterocíclicos são considerados a classe de compostos dotados de mais propriedades biológicas a serem exploradas: propriedades farmacêuticas, agroquímicas e veterinárias são amplamente reconhecidas cientificamente (GILCHRIST, 1992). O medicamento sildenafil, a vitamina B1 (Tiamina) e o celecoxibe são exemplos de compostos que apresentam em suas estruturas os heterocíclicos (MALAVOLTA, 2012). De acordo com suas propriedades, estes

compostos foram categorizados no Sistema de Classificação Biofarmacêutica e no Sistema de Classificação de Disposição de Fármaco Biofarmacêutico (KEEMINK *et al.*, 2015).

Dentro dos sistemas heterocíclicos, destacam-se as pirimidinonas e seus derivados em geral, por sua importância medicinal e biológica (MALAVOLTA, 2012). As pirimidinonas correspondem a derivados oxigenados das pirimidinas, conhecidas por estarem presentes em muitas estruturas de moléculas dotadas de atividade biológica (BROWN; MASON, 1962). Esta classe de heterocíclicos apresenta em sua estrutura química duas diazinas, compostos heterocíclicos de seis membros contendo dois átomos de nitrogênio em sua estrutura nas posições 1 e 3, respectivamente (MENDONÇA JUNIOR, 2003).

As pirimidinonas estão intimamente relacionadas com os ácidos nucleicos e, talvez por conta da similaridade estrutural com estas biomoléculas, drogas anti-hipertensivas (BERNHART *et al.*, 1994), antitumorais (STRINGFELLOW, 1981), antivirais (SALADINO *et al.*, 2002), indutoras de interferon (VROEGOP *et al.*, 1999), hipoglicêmicas (MADHAVAN *et al.*, 2002), anticonvulsivantes (WHITE *et al.*, 2004), anti-histamínicas (TEMPLE *et al.*, 1979), analgésicas e anti-inflamatórias (RANISE *et al.*, 1994) já foram sintetizadas contendo anéis pirimidinônicos em suas estruturas.

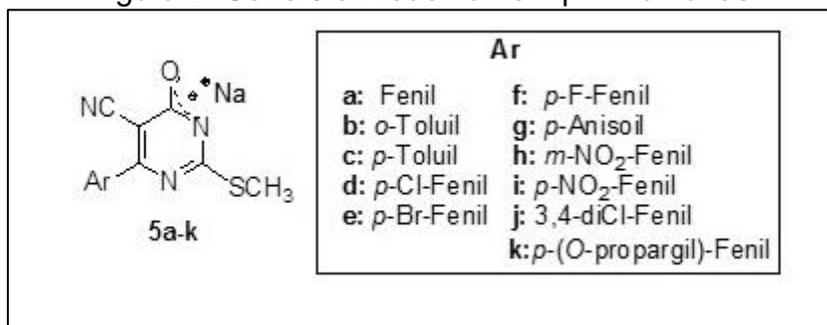
2.3.2 Síntese multicomponente de compostos contendo o anel de pirimidinona

No que se trata da síntese de compostos contendo as pirimidinonas, o grupo de pesquisa do Departamento de Química Fundamental CCEN/UFPE, há alguns anos, tem se dedicado à síntese e à descoberta de novos candidatos a fármacos que contém as pirimidinonas em suas estruturas (MENDONÇA JUNIOR *et al.*, 2005; FALCÃO *et al.*, 2006; DOS ANJOS *et al.*, 2012). Sendo assim, como parte do conjunto de trabalhos desenvolvidos com os heterocíclicos, uma série de pirimidinonas, com estrutura semelhante aos antagonistas α_1 -adrenérgicos foi sintetizada por meio de uma estratégia multicomponente. Esta nova metodologia sintética diminui o tempo de síntese e promove o aumento dos rendimentos das moléculas obtidas por esta via.

A primeira série foram as tiometil-pirimidinonas e a segunda as 2-morfolino-pirimidinonas. Das duas séries avaliadas, a mais promissora até o presente momento foi a dos sais sódicos das tiometil-pirimidinonas (Figura 2) em que alguns desses compostos reduziram a ação induzida pela fenilefrina em artéria aorta de ratos

(ANDRADE *et al.* 2017).

Figura 2. Série 5 a-k das tiometil-pirimidinonas.



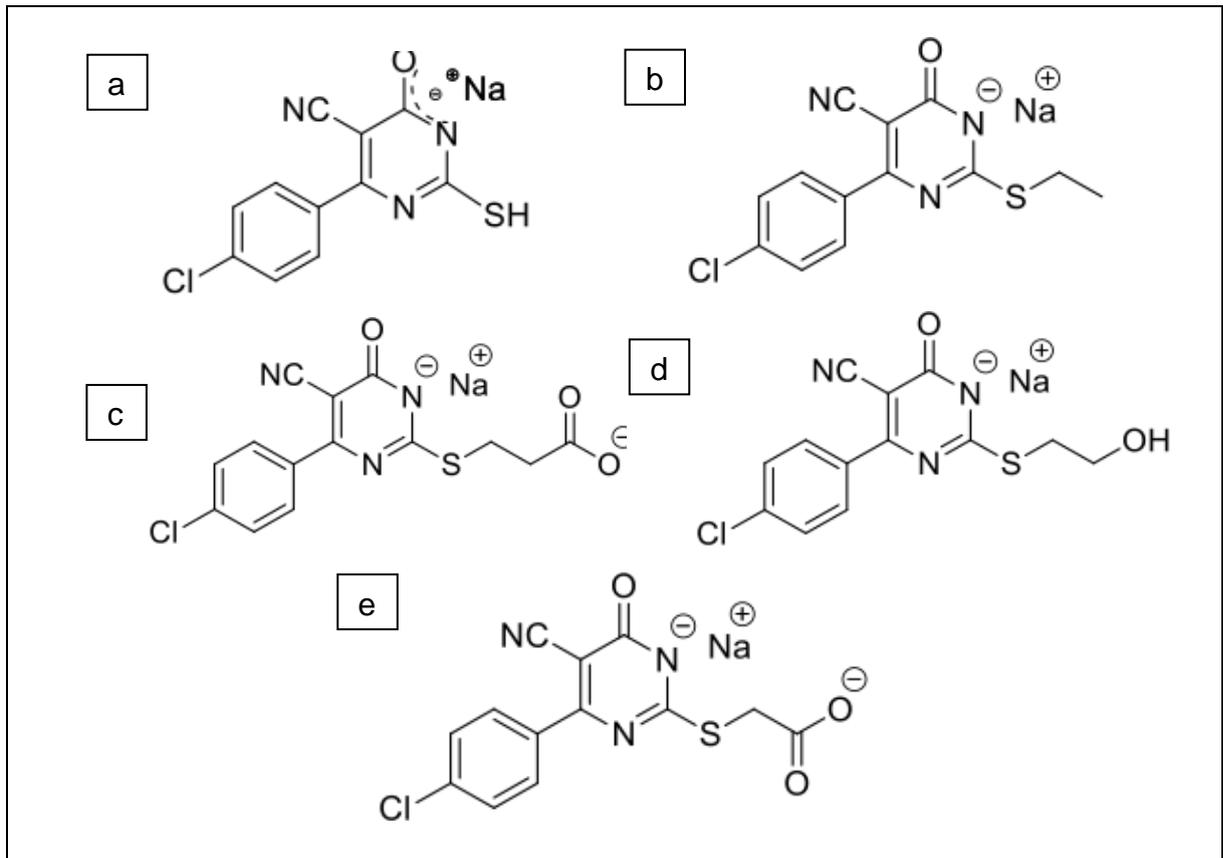
Considerando ainda as tiometilpirimidinonas (dados não publicados), foram realizadas modificações em C-2, onde tem-se o grupo tiometil, em que foi retirado a metila e substituídas pelo grupo toluil ou pelo átomo de cloro. No entanto, a nova substituição não favoreceu a ação dos compostos, tendo em vista que a porcentagem de inibição da ação da Phe foi reduzida em anéis de artéria aorta sem endotélio. Ainda, o derivado halogenado foi mais ativo que o derivado não halogenado, o que indica que o padrão de substituição com átomos de halogênio é importante para a manutenção da atividade.

A segunda série sintetizada e testada foi a das 2-morfolino-pirimidinonas (dados não publicados), feita para tentar entender melhor a influência do grupo substituinte em C-2 do anel da pirimidinona. Nesta série, o composto mais ativo foi substituído com dois átomos de cloro no anel aromático em C-6 do anel da pirimidinona reduzindo em 60% a contração induzida pela Phe, fortalecendo a hipótese de que compostos halogenados tendem a ser melhores candidatos a fármacos. Dois desses compostos ao serem avaliados em anéis de artéria aorta na presença do endotélio foram capazes de reduzir a contração induzida pela Phe, surgindo a hipótese de que esses podem ser agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos.

Com base em estudos de relação estrutura-atividade realizados pelo nosso grupo e tentando-se uma melhoria no perfil farmacológico, novas modificações químicas foram propostas contendo o chassi molecular tio-pirimidinônico, em que foram obtidos os novos compostos: STICL, STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet,

SATICL (Figura 3). Estes apresentam um padrão de substituição de retirada do grupo metil no enxofre e a adição de grupos funcionais para avaliar o quão benéfico seria para a atividade. Estes novos compostos foram os avaliados no atual trabalho.

Figura 3. Estrutura química dos novos compostos pirimidinônicos: a) STICL, b) STICL-Et, c) STICL-Prop, d) STICL-Acet, e) SATICL.



Diante do exposto, torna-se claro que o desenvolvimento destas moléculas contendo o anel de pirimidinona é bastante promissor, uma vez que os antagonistas α_1 -adrenérgicos podem ser utilizados para diferentes condições e os atualmente existentes apresentam algumas limitações clínicas.

3 HIPÓTESE

Os novos compostos contendo o anel de pirimidinona são antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos e apresentam baixa citotoxicidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar as possíveis ações citotóxicas de novos compostos contendo o anel de pirimidinona (STICL, STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet, SATICL) e caracterizar suas ações sobre os receptores α_1 -adrenérgicos em ratos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos pirimidinônicos;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre os receptores α_1 -adrenérgicos em artéria aorta de ratos;
- Caracterizar a ação antagonista dos compostos sobre os receptores α_1 -adrenérgicos em ducto deferente de ratos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos compostos

Os compostos foram fornecidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica/Departamento de Química Fundamental/CCEN da Universidade Federal de Pernambuco, coordenado pela Profa. Dra. Janaina Versiani dos Anjos.

5.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus* var. *albinus*), com 2-3 meses de idade, pesando em torno de 250-320g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE e mantidos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória-UFPE. Estes animais receberam dieta padrão de biotério (Nuvilab®) e água filtrada *ad libitum*.

Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclos claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo nº 0072/2020).

5.3 Ensaios de citotoxicidade

Visando o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, utilizou-se cultura de células para avaliar possíveis ações citotóxicas dos compostos. Foi realizado o teste do MTT em células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) e células do músculo liso da artéria aorta torácica de embrião de rato (A7r5). Estas linhagens celulares foram escolhidas para comparar a eficácia dos compostos em artéria aorta no ensaio de reatividade com a citotoxicidade.

As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura de células (25' ou 75cm²), contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e glutamina 2 mM; pH 7,4 à temperatura de 37°C em atmosfera úmida (5% de CO₂), até a 15ª passagem, com uma taxa de repique de 1:4. O repique foi realizado a cada 4 ou 5 dias após as células atingirem 80% de confluência. As células foram divididas em dois grupos e submetidas aos diferentes tratamentos descritos:

Controle negativo: Não houve a aplicação de nenhuma substância nas células deste grupo, embora tenham passado por todos os processos pelos quais os grupos

experimentais passaram;

Grupo teste: As células foram tratadas com 100 $\mu\text{mol/L}$ dos compostos por 30min (mesma concentração e tempo utilizados nos ensaios de reatividade vascular em aorta de ratos).

Após as células atingirem a confluência, foi realizada a depleção do soro fetal bovino (FBS 0% por 3-5h). Então, foram incubados os compostos na concentração de 10^{-4} mol/L. Após 30 min de incubação com as moléculas teste, as células foram lavadas com PBS (1X) a 37°. As amostras foram incubadas na estufa por 3 horas a 37° C com o MTT (0,2 mL por poço, placa de 96 poços). Transcorrido o tempo, a solução foi aspirada e o precipitado foi solubilizado com DMSO (100 μL /poço). O volume de 100 μL do poço da placa de 96 wells foi passado para uma nova placa de 96 poços (feito duplicata). O formazam solubilizado foi quantificado em leitor de ELISA (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de 550 nm. Os resultados foram expressos em absorbância de formazam por 1×10^6 células. Para este teste foi utilizado o Thiazolyl blue tetrazolium bromide MTT (Sigma-Aldrich M2128). Para interpretação dos resultados, foi utilizado o ponto de corte estabelecido pela ISO 10993-5, em quem compostos são considerados citotóxicos quando reduzirem a viabilidade celular para menos de 70% (International Standard Organization, ISO 10993).

5.4 Experimentos funcionais

5.4.1 Preparação da artéria aorta

Após anestesiados com isoflurano, os animais foram eutanasiados por decapitação. A artéria aorta torácica foi isolada e removidos os tecidos conjuntivos e gordura. Em seguida, a artéria aorta foi cortada em anéis de 4 mm de comprimento e foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixo à cuba. As respostas foram registradas em um sistema de aquisição (AVS). Os anéis foram incubados em câmaras para órgãos isolados contendo 10 mL de solução de Krebs modificado com a seguinte composição (em mM): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C.

Após montados, os anéis de aorta permaneceram numa tensão basal pré-estabelecida (1,5 g) durante uma hora, sendo lavadas a cada 15 minutos, para estabilização. Em seguida foi realizado o teste de viabilidade vascular, em que os anéis foram considerados viáveis quando contraíssem ao menos 1 g após adição da fenilefrina (Phe) (0,1 $\mu\text{mol/L}$).

Para avaliarmos o efeito dos compostos o endotélio vascular foi removido mecanicamente, e a efetividade da remoção foi demonstrada através da ausência de relaxamento na presença da acetilcolina (ACh, 1 $\mu\text{mol/L}$) nos anéis pré-contraídas com a EC_{50} da Phe (0,1 $\mu\text{mol/L}$).

5.4.2 Avaliação do efeito dos compostos em artéria aorta

Foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para a fenilefrina (agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos) na ausência e presença dos novos compostos (100 $\mu\text{mol/L}$) ou o antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos prazosina (100 $\mu\text{mol/L}$, controle positivo), em anéis de artéria aorta de ratos, na ausência do endotélio. Os compostos ou a prazosina foram adicionadas ao banho 30 minutos antes da realização da curva concentração-efeito para a fenilefrina.

A partir das curvas concentração-efeito obtidas, foram calculados o Efeito máximo (E_{max}) e o pEC_{50} , que corresponde ao logaritmo negativo da EC_{50} .

5.4.3 Preparação do ducto deferente

Após anestesiados com isoflurano, os animais foram mortos por decapitação. A porção epididimal do DD foi identificada, isolada e dissecada dos tecidos conjuntivos. Em seguida foram cortados em tiras de 1 cm, foram transferidos para uma cuba para órgãos isolados (10 mL) contendo solução Tyrode (em mM: NaCl 138,0; KCl 5,7; CaCl_2 1,8; NaHCO_3 15,0; NaH_2PO_4 0,36; e glicose 5,5). As tiras de DD foram mantidas à temperatura constante de 30°C, pH 7,4, sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2).

As tiras dos DD foram fixadas por meio das extremidades, em que uma ficou fixa à base da cuba e a outra conectada a um transdutor para registro das contrações isométricas. As respostas foram registradas em um sistema de aquisição (AVS

Projetos, Brasil). Todos os experimentos foram feitos na presença de um coquetel de inibidores contendo desipramina (0,1 $\mu\text{mol/L}$), corticosterona (10 $\mu\text{mol/L}$), e propranolol (0,1 $\mu\text{mol/L}$) para bloquear a captação neuronal, extraneuronal e antagonizar os adrenoceptores β_2 , respectivamente.

De modo a ser estabelecida a tensão que resultaria numa melhor resposta contrátil do DD, foi realizado um teste de tensão basal. Para tal, os DD permaneceram numa tensão de 0,5 g e após 30 min foi estimulado com noradrenalina (3 $\mu\text{mol/L}$). Em seguida, a preparação foi lavada e submetidas a uma tensão de 0,75 g e foi realizado o mesmo estímulo, procedimento que se repetiu com as tensões de 1g e 1,5g. A tensão que o ducto apresentou uma melhor resposta contrátil foi a tensão de 0,5 g e, portanto, foi escolhida como a tensão utilizada neste trabalho.

Após 30 min de estabilização, na tensão de 0,5 g, foram realizados de 3 a 4 estímulos com noradrenalina (3 $\mu\text{mol/L}$) no DD, com um intervalo de 20 min entre cada pulso, até que a resposta fosse reproduzível, antes da adição do composto ou da prazosina.

5.4.4 Protocolos para caracterização do composto

Após a obtenção de respostas reproduzíveis para a noradrenalina, foram realizadas estímulos para a noradrenalina (3 $\mu\text{mol/L}$) na presença e ausência do STICL-Et (0,3 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 300 $\mu\text{mol/L}$) ou prazosina (0,001 nmol/L, 0,003 nmol/L, 0,01 nmol/L, 0,03 nmol/L, 0,1 nmol/L, 0,3 nmol/L, 1 nmol/L, 3 nmol/L, 10 nmol/L, 30 nmol/L, 100 nmol/L, 300 nmol/L) a fim de obtermos a pIC_{50} .

5.5 Análise Estatística

Os resultados de tensão isométrica obtidos nos experimentos no banho de órgãos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) de experimentos obtidos em diferentes animais.

As determinações da EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima), pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração que produz 50% da resposta máxima), IC_{50} (concentração do antagonista que reduz em 50% o efeito máximo do agonista) e pIC_{50} (logaritmo negativo da concentração do antagonista que reduz em 50% o efeito máximo do agonista) foram realizadas utilizando-se o método de

regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Corporation).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Corporation). A diferença entre os grupos foi verificada pelo ANOVA de uma via, seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $< 5\%$.

6 RESULTADOS

6.1 Ensaio de citotoxicidade

Para determinação da citotoxicidade dos compostos tiometil-pirimidinônicos, eles foram incubados nas concentrações de 100 $\mu\text{mol/L}$, durante 30 min, em células A7r5 e HUVEC. A porcentagem de viabilidade celular dos compostos em HUVEC, variou entre 86,8 e 100%, enquanto que em células A7r5 variou entre 72,6 e 111,9% (Figuras 4 e 5).

Quando expostas ao composto STICL-Et, a linhagem celular HUVEC apresentou viabilidade de 95,6%, enquanto que a linhagem celular A7r5, 111,9%.

Figura 4. Viabilidade celular (%) de HUVEC pelo ensaio MTT após 30 min de tratamento com os compostos STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet e SATICL, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. As barras representam a porcentagem de viabilidade celular de 4 experimentos.

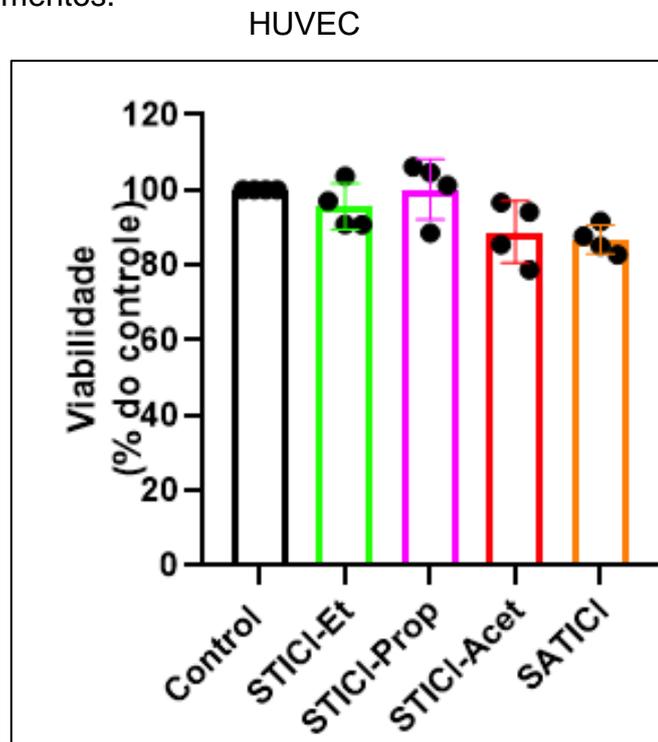
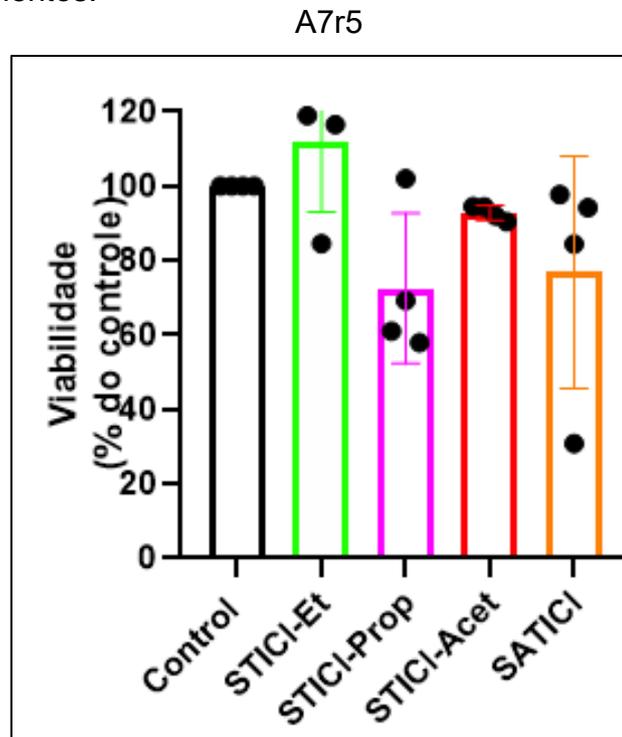


Figura 5. Viabilidade celular (%) de células A7r5 pelo ensaio MTT após 30 min de tratamento com os compostos STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet e SATICL, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. As barras representam a porcentagem de viabilidade celular de 4 experimentos.



6.2 Experimentos funcionais

6.2.1 Avaliação do efeito dos compostos em artéria aorta de ratos

Após a realização das curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina, na ausência e presença dos compostos, em anéis de artéria aorta sem endotélio, como mostrado na Figura 06 e Tabela 02, apenas o composto STICL-Et foi capaz de abolir a contração induzida pela fenilefrina, efeito semelhante ao da prazosina, efeito semelhante ao da prazosina.

Figura. 6. Efeito dos compostos tiometil-pirimidinônicos sobre a contração induzida pela fenilefrina em aorta torácica de ratos. As curvas representam a resposta contrátil induzida pela fenilefrina na ausência e presença dos compostos STICL, STICL-Et, STIC-Prop, STICL-Acet, SATICL (100 $\mu\text{mol/L}$) ou do antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (Prazosina, 100 $\mu\text{mol/L}$), em anéis sem endotélio. Os pontos representam média \pm erro padrão da média 2-8 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * Diferença estatística em relação ao controle(fenilefrina). (ANOVA de uma via, seguida de Newmann-Keuls).

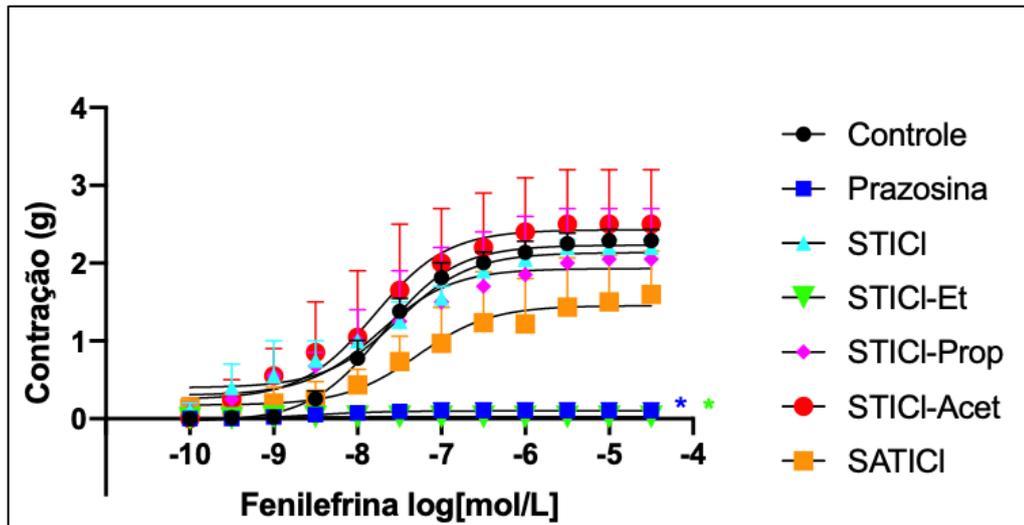


Tabela 3. Contração induzida pela fenilefrina em aorta torácica de ratos na ausência ou na presença dos compostos tiometil-pirimidinônicos (100 $\mu\text{mol/L}$) ou do antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (Prazosina, 100 $\mu\text{mol/L}$).

Molécula	Efeito máximo de contração induzido pela fenilefrina (g)	Porcentagem de inibição (%)
Controle	2.28 \pm 0.14	-
Prazosina	0.10 \pm 0.10*	100
STICL	2.2 \pm 0.10	0
STICL-ET	0.12 \pm 0.09*	100
STICL-Prop	2.05 \pm 0.65	11
STICL-Acet	2.50 \pm 0.70	0
SATICL	1.90 \pm 0.54	16

*diferença estatística em relação ao controle (fenilefrina) (ANOVA de uma via, seguida de Newmann-Keuls).

O STICL-Et foi o composto que obteve uma melhor resposta no ensaio de citotoxicidade e de reatividade vascular e, por isso, foi o escolhido para a caracterização no DD.

6.2.2 Determinação da pIC_{50} em ducto deferente de ratos

Foram realizados estímulos para a noradrenalina ($3 \mu\text{mol/L}$) na presença e ausência de concentrações crescentes do STICL-Et (Figura 7) ou prazosina (Figura 8) e foi calculada a pIC_{50} do STICL-Et e da prazosina em DD.

Como mostrado na figura 7 e 8 o STICL-Et apresentou uma menor pIC_{50} ($pIC_{50} = 4,6 \pm 0,12$) que a prazosina ($pIC_{50} = 8,2 \pm 0,18$). Ainda, na concentração de $300 \mu\text{mol/L}$ o STICL-Et foi capaz de abolir a ação da noradrenalina (Figura 7), enquanto que a prazosina aboliu a ação da noradrenalina na concentração de 100 nmol/L (Figura 8).

Figura 7. Efeito do STICL-Et sobre a contração induzida pela noradrenalina sobre o ducto deferente de ratos. As curvas representam a resposta contrátil induzida pela noradrenalina na presença de concentrações crescentes de STICL-Et ($100 \mu\text{mol/L}$). Os pontos representam média \pm erro padrão da média de 7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

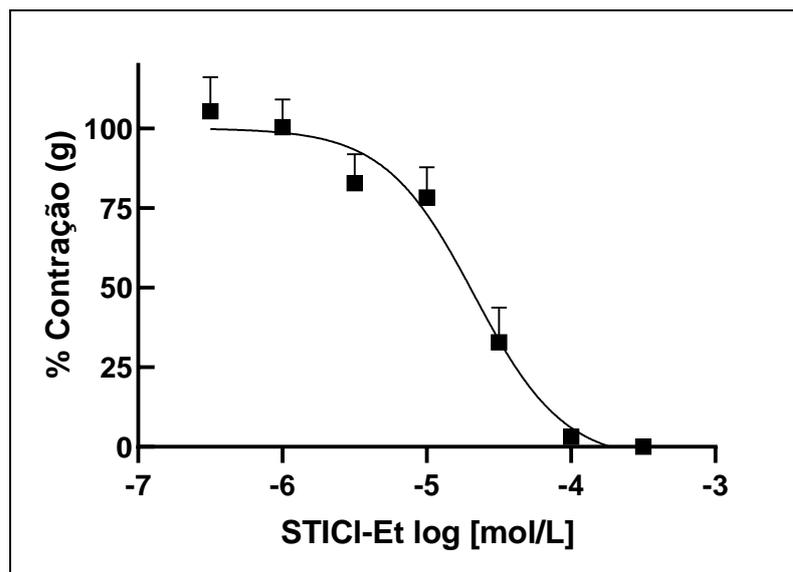
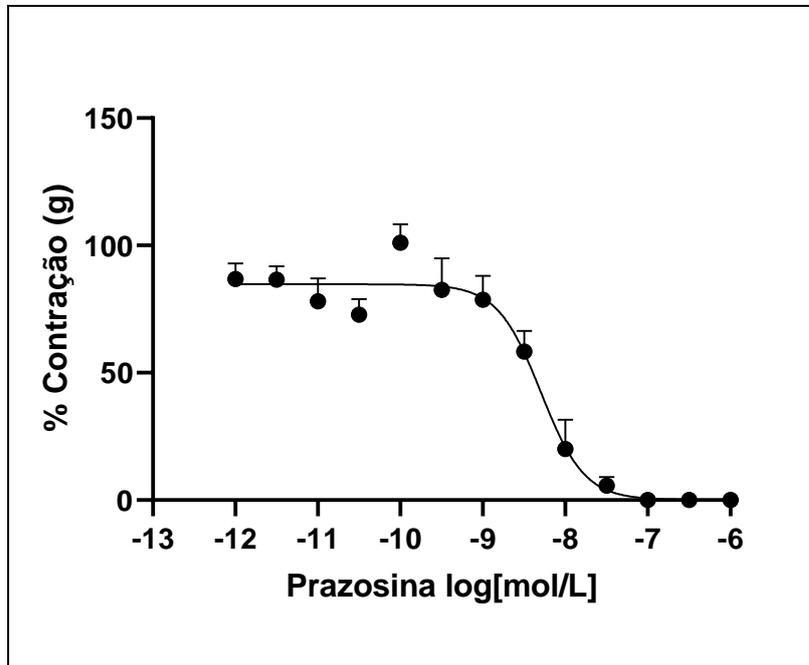


Figura 8. Efeito da prazosina sobre a contração induzida pela noradrenalina sobre o ducto deferente de ratos. As curvas representam a resposta contrátil induzida pela noradrenalina na presença de concentrações crescentes de prazosina. Os pontos representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.



7 DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou alguns novos compostos contendo o anel de pirimidinona com alguma analogia estrutural aos antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos.

Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade dos compostos. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* consiste no primeiro teste para avaliar a segurança de uso de qualquer material para fins biomédicos (International Standard Organization, ISO 10993). Sendo assim, análises sobre a viabilidade celular foram realizadas para avaliar a função das células diante dos compostos em teste, detectável por produto de enzima específica que determina atividade vital: MTT.

O teste de MTT avalia a viabilidade celular por meio da enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado no uso do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, de cor amarelada para azul de formazana, ocorre apenas em células viáveis, sendo sua densidade diretamente proporcional ao número de células presentes (Mosmann, 1983).

Após a realização do ensaio MTT todas as culturas celulares (tanto A7r5 quanto na HUVEC) apresentaram um viabilidade celular acima de 70%. Uma vez que, de acordo com a ISO 10993-5 (International Standard Organization, ISO 10993), compostos que reduzem a viabilidade celular para até 70% são considerados não citotóxicos, todos os compostos avaliados podem ser considerados não citotóxicos para as células avaliadas e nas condições utilizadas.

Em seguida, foi avaliado o efeito dos compostos sobre a contração induzida pelo agonista fenilefrina, um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, em anéis de artéria aorta sem endotélio de ratos. Foi observado que o composto STICL-Et na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ foi capaz de abolir a resposta à fenilefrina em anéis de artéria aorta. Este composto, assim como os demais avaliados, foram sintetizados tendo como base o chassi tiometilpirimidinônico, que foi a primeira classe sintetizada pelo laboratório de síntese orgânica da UFPE. Muitos destes compostos foram capazes de inibir a contração induzida pela fenilefrina na aorta isolada de ratos. Foi observado, ainda, que a presença de átomos eletronegativos no anel aromático tem influência na atividade. Todos os compostos que contêm halogênios no anel aromático apresentaram boa inibição da contração induzida pela fenilefrina

(ANDRADE *et al.*, 2016).

De modo a procurar entender melhor como alterações estruturais podem afetar a atividade vasoativa e a melhorar o perfil farmacológico, modificações químicas foram propostas contendo o chassi molecular tio-pirimidinônico, em que foram obtidos os compostos: STICL, STICL-Et, STICL-Prop, STICL-Acet, SATICL, compostos avaliados no atual trabalho. Destes compostos, o mais promissor é o STICL-Et, que, além de ter sido não citotóxico nas condições estudadas, foi capaz de abolir a contração induzida pela Phe em anéis de artéria aorta sem endotélio.

No entanto, é importante frisar que não se pode excluir a possibilidade de os outros compostos também apresentarem esta atividade em concentrações mais altas. Além disso, é necessário aumentar o número de amostras dos demais compostos, a exemplo o SATICL que, embora não apresente uma diferença estatística no seu Emax, demonstra uma tendência de reduzir a ação da Phe. Diante dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e de reatividade vascular, o STICL-Et foi o selecionado para a caracterização em ducto deferente de ratos.

Os antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos têm sido alvo de estudo de muitos compostos. O STICL-Et reduziu a potência e o Emax da fenilefrina em concentrações de 100 $\mu\text{mol/L}$, diferente de achados de Marona *et al.* (2011) que, ao avaliar derivados de piperazina em artéria aorta de ratos, observaram que os compostos foram capazes de reduzir apenas a potência da fenilefrina. No entanto, é importante ressaltar que as concentrações dos compostos do estudo citado foram menores (30 nmol/L, 100 nmol/L e 300 nmol/L) do que as utilizadas no nosso estudo. Ainda, derivados aroxialquil da 2-metoxifenilpiperazina, avaliados por Kubacka e *et al.* (2013), reduziram apenas a potência da noradrenalina em artéria aorta de ratos nas mesmas concentrações utilizadas por Marona *et al.* (2011). Novas concentrações dos nossos compostos serão testadas para avaliar o possível efeito sobre a potência.

Para comparar a potência do possível antagonista STICL-Et com um antagonista já conhecido (prazosina), foi calculada a pIC_{50} do STICL-Et e da prazosina em ducto deferente de ratos. A pIC_{50} da prazosina foi menor que a pIC_{50} do STICL-Et, indicando que o nosso composto é menos potente que a prazosina, embora ainda seja capaz de abolir a contração da noradrenalina na concentração de 300 $\mu\text{mol/L}$.

Ao se avaliar a pIC_{50} da conotoxina rho-TIA, um peptídeo do caracol marinho,

Lima e colaboradores (2005) puderam também observar que a mesma também apresentou uma menor potência ($pIC_{50}=7,18$) que a prazosina ($pIC_{50}=9,14\pm 0,09$). Este estudo utilizou uma concentração menor que o STICL-Et. O rho-TIA aboliu a ação da noradrenalina em ducto deferente de ratos na concentração de $1 \mu\text{mol/L}$ (Lima, *et al.* 2005). Já a pIC_{50} da tamsulosina, antagonista mais seletivo para os receptores α_{1A} e α_{1D} , em ducto deferente de ratos foi em torno de 9,08 (KIGUTI e PUPO, 2012) potência esta semelhante à da prazosina e ainda maior que a potência do STICL-Et.

Em artéria aorta o STICL-Et aboliu a ação da Phe na concentração de $100 \mu\text{mol/L}$, enquanto que em ducto deferente ele precisou de uma concentração ainda maior para abolir a ação da noradrenalina ($300 \mu\text{mol/L}$). Assim, o STICL-Et pode ter uma maior afinidade pelo receptor α_{1D} -adrenérgico, já que em artéria aorta temos uma maior quantidade desse subtipo de receptores, enquanto que no ducto o subtipo que predomina é o α_{1A} -adrenérgico (LIMA, *et al.* 2005). Assim, embora o STICL-Et apresente uma menor potência que os demais antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos, este pode ser um antagonista desses receptores.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos achados, os novos compostos pirimidínicos não são citotóxicos para as células e nas condições avaliadas.

Ao se avaliar o efeito dos compostos em artéria aorta, o STICL-Et apresentou um efeito mais promissor ao reduzir a ação da fenilefrina em 100%, podendo então ser um antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de os outros compostos também terem esta atividade.

Em ducto deferente o STICL-Et apresentou uma menor potência que a prazosina.

Faz-se necessário mais protocolos para realmente comprovar que o STICL-Et é antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos. Então, ainda serão construídas curvas concentração-efeito cumulativas para a noradrenalina em ducto deferente de ratos na concentração 30 $\mu\text{mol/L}$ do STICL-Et. Também será determinado a pIC_{50} deste composto em artéria aorta de ratos para compararmos a potência nesses dois tecidos e serão construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o KCl. Por fim, serão realizados estudos de *Binding*, de modo a comprovarmos que a ação do STICL-Et realmente é sobre os dos receptores α_1 -adrenérgicos.

REFERÊNCIAS

- AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 153, n. 3, p. 586-600, 1948.
<https://doi/pdf/10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586>
- AKINAGA, J.; GARCÍA-SÁINZ, J. A.; PUPO, A. S. Updates in the function and regulation of α 1-adrenoceptors. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 14, p. 2343-2357, 2019.
<https://doi.org/10.1111/bph.14617>
- ANDRADE, A. N. de *et al.* Vasoactive Thiomethyl-Pyrimidines: Promising Drug Candidates with Vascular Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1266-1273, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160289>.
- ANJOS J. V. Comparative Computational Studies of 3,4-Dihydro-2,6 diaryl- 4 oxo-pyrimidine-5-carbonitrile Derivatives as Potential Antinociceptive Agents. **Molecules** , v. 17, p. 809-819, 2012.
<https://doi.org/10.3390/molecules17010809>
- BARROSO, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial– 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.
<https://doi.org/10.36660/abc.20201238>.
- BARTSCH, G. *et al.* Light microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 122, n. 4, p. 487–491, 1979. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)
- BEACH, M. A.; MAURO, L. S. Pharmacologic expulsive treatment of ureteral calculi. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, n. 7–8, p. 1361–1368, 2006.
[http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)
- BELAYNEH, M.; KOROWNYK, C. Treatment of lower urinary tract symptoms in benign prostatic hypertrophy with α -blockers. **Canadian Family Physician**, v. 62, n. 9, p. e523, 2016. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)
- BERNHART, C.A., *et al.* -3H-dihydro-pyrimidinones as Angiotensin II AT1 receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 157-162, 1994. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000034745.98129.EC>
- BERRY, S. J. *et al.* The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **Journal of Urology**, v. 132, n. 3, p. 474–479, 1984.
[http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)
- BOYLE, P.; NAPALKOV, P. The epidemiology of benign prostatic hyperplasia and observations on concomitant hypertension. **Scandinavian Journal of Urology and nephrology**, v. 168, p. 7-12, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **VIGITEL Brasil 2019: Vigilância de fatores de risco e**

proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2018. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 28 de set. de 2020.

BROWN, D.J., MASON, S.F. The Pyrimidines. **Interscience Publishers**, p. 31-115, 1962.

BURT, R. P.; CHAPPLE, C. R.; MARSHALL, I. Evidence for a functional α 1A-(α 1C-) adrenoceptor mediating contraction of the rat epididymal vas deferens and an α 1B- adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. **British journal of pharmacology**, v. 115, n. 3, p. 467-475, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb16356.x>

CAINE, M.; RAZ, S.; ZEIGLER, M. Adrenergic and Cholinergic Receptors in the Human Prostate, Prostatic Capsule and Bladder Neck. **British Journal of Urology**, v. 47, n. 2, p. 193–202, 1975. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)

CARROLL, W. A. *et al.* Two novel and potent 3-[(o-methoxyphenyl) piperazinylethyl]-5-phenylthieno [2, 3-d] pyrimidine-2, 4-diones selective for the α 1D receptor. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 9, p. 1119-1121, 2001.

CHON, J. K., *et al.* Alpha1-adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia. **The Journal of urology**, v.161, n.6, p. 2002-2008, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68873-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68873-8)

COSTA, M. B. **Síntese de trifluormetil cicloalca-[d]- 2(1H) pirimidinonas e tioperimidinonas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

DALY, C. J. *et al.* A knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular α 1B-adrenoceptors in mouse. **Physiological Genomics**, v. 2002, n. 9, p. 85–91, 2002. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00065.2001>

DEGER, G. Effect of terazosin on serum lipids. **The American Journal of Medicine**, v. 80, n. 5, supl. 2, p. 82–85, 1986. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)

DE MEY, J.; VANHOUTTE, P. M. Uneven distribution of postjunctional alpha1- and alpha2 like adrenoceptors in canine arterial and venous smooth muscle. **Circulation Research**, v. 48, n. 6, p. 875–883, 1981. <https://doi.org/10.1161/01.RES.48.6.875>

DU, L.; LI, M. Modeling the Interactions Between α 1-Adrenergic Receptors and Their Antagonists. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 6, n. 3, p. 165–178, 2010. <https://doi.org/10.2174/157340910791760082>

EIRAS, S. *et al.* Doxazosin induces activation of GADD153 and cleavage of focal

adhesion kinase in cardiomyocytes en route to apoptosis. **Cardiovascular research**, v.71, n.1, p.118-128, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.03.014>

FALCÃO, E. P. D. S. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3-and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 2, p. 276-282, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.09.009>

FRISHMAN, W. H.; EISEN, G.; LAPSKER, J. Terazosin: A New Long-Acting α_1 -Adrenergic Antagonist for Hypertension. **Medical Clinics of North America**, v. 72, n. 2, p. 441–448, 1988. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30778-7](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30778-7)

FURUYA, S. *et al.* Alpha-adrenergic activity and urethral pressure in prostatic zone in benign prostatic hypertrophy. **Journal of Urology**, v. 128, n. 4, p. 836–839, 1982. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53216-4](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53216-4)

GILCHRIST, T. L. **Heterocyclic chemistry**. 2 ed. Inglaterra: Editora Longman Scientific e Technical, 1992. p.248-276, cap.7.

GÓMEZ-ZAMUDIO, J. *et al.* Evidence for the Use of Agonists to Characterize α_1 -Adrenoceptors in Isolated Arteries of the Rat. **In proceedings-western pharmacology society**, v. 45, p.159-160, 2002.

GONZÁLEZ-JUANATEY, J. R. *et al.* Doxazosin induces apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro by a mechanism that is independent of α_1 -adrenergic blockade. **Circulation**, v.107, n.1, p.127-131, 2003. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000043803.20822.D1>

GOSLING, J.; CHILTON, C. The anatomy of the bladder, urethra, and pelvic floor. In: Urodynamics: Principles, Practice, and Applications. Edited by A. Mundy, T. STEPHENSON, AND A. WEIN. Churchill Livingstone: London, p. 3-13,1984. *apud* MALLOY, *et al.* Alpha1-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. **The Journal of urology**, v. 160, n. 3 Part 1, p. 937-943, 1998.

GRIMM, R. H. *et al.* Long-term effects on plasma lipids of diet and drugs to treat hypertension. **Journal of the American Medical Association**, v. 275, n. 20, p. 1549–1556, 1996. <http://doi.org/10.1001/jama.275.20.1549>

GUS, I. *et al.* Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 5, p. 424–433, 2004. <http://doi.org/10.1590/s0066-782x2004001700009>

HAYES, J. M.; GRAHAM, R. M.; O'CONNEL, B. P. Prazosin in Hypertension. **British Medical Journal**, v. 4, n. 5936, p. 108, 1974. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5936.108-c>

HIEBLE, J.P. *et al.* International Union of Pharmacology. X, Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update, **Pharmacol. Rev**, v. 47, p. 267–270, 1995.

HO, S.L.; HONNER, V.; DOCHERTY, J.R. Investigation of the subtypes of α_2 -adrenoceptor mediating prejunctional inhibition in rat atrium and cerebral cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 357, p. 634–639, 1998.
DOCHERTY, J. R. The pharmacology of α_1 -adrenoceptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 855, p. 305-320, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.047>

HOLLINGSWORTH, J. M. *et al.* Medical therapy to facilitate urinary stone passage: a meta-analysis. **Lancet**, v. 368, n. 9542, p. 1171–1179, 2006.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69474-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69474-9)

HWA, J.; GRAHAM, R. M.; PEREZ, D. M. Identification of critical determinants of α_1 -adrenergic receptor subtype selective agonist binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 39, p. 23189-23195, 1995.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.23189>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. ISO 10993-5. 3. ed. [Genebra]: ISO, 01 jun. 2009.

MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. **Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novos 3,4-dihidro-2,6-diaril-4-oxo-pirimidina-5-carbonitrilas**. 2003. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

MEMDONÇA JUNIOR, F. J. B., *et al.* A simple approach for the synthesis of 2, 6-diaryl-4-oxo-3, 4-dihydropyrimidine-5-carbonitriles. **Heterocyclic Communications**, v. 11, n. 6, p. 479-484, 2005.

KAMIKIHARA, S. Y. *et al.* Differential distribution of functional α_1 -adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 753–761, 2005.
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.087502>

KEEMINK, J. *et al.* In vitro disposition profiling of heterocyclic compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, n.491, n. 1-2, p.78-90, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.080>

KENNY, B. A. *et al.* Characterization of an α_1D -adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 6, p. 981–986, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15907.x>

KIGUTI, A. L. R.; PUPO, A. S. Investigation of the Effects of α_1 -Adrenoceptor Antagonism and L-Type Calcium Channel Blockade on Ejaculation and Vas Deferens and Seminal Vesicle Contractility In Vitro. **The journal of sexual medicine**, v. 9, n. 1, p. 159-168, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02410.x>

KÖNIG, M. *et al.* Antihypertensive Treatment Patterns and Blood Pressure Control in Older Adults: Results from the Berlin Aging Study II. **Drugs and Aging**, v. 35, n. 11,

p. 993–1003, 2018. <http://doi.org/10.1007/s40266-018-0580-0>

KUBACKA, M. *et al.* The hypotensive activity and alpha1-adrenoceptor antagonistic properties of some aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 335–344, 2013.

<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.025>

KYPRIANOU, N. Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: Clinical significance. **Journal of Urology**, v. 169, n. 4, p. 1520–1525, 2003. <http://doi.org/10.1097/01.ju.0000033280.29453.72>

LACHNIT, W. G. *et al.* Pharmacological characterization of an $\alpha(1A)$ -adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat.

British Journal of Pharmacology, v. 120, n. 5, p. 819–826, 1997.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0700983>

LANDS, A. *et al.* Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature**, v. 214, n.5088, p. 597-598, 1967. <https://doi.org/10.1038/214597a0>

LANGER, S. Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. **Biochemical Pharmacology**, v.23, n. 13, p. 1793–1800, 1974. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90187-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90187-7)

LEPOR, H. *et al.* Localization of the alpha 1A-Adrenoceptor in the Human Prostate. **The Journal of Urology**, v. 154, n. 6, p. 2096–2099, 1995.

[https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)66704-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)66704-1)

LEPOR, H. *et al.* Laboratory assessment of terazosin and alpha-1 blockade in prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 32, n. 6 SUPPL., p. 21–26, 1988.

LIMA, V. *et al.* Differential antagonism by conotoxin ρ -TIA of contractions mediated by distinct $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. **European journal of pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 183-192, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.12.011>

LIN, J. S. **Behavioral counseling to promote a healthy lifestyle for cardiovascular disease prevention in persons with cardiovascular risk factors: An updated systematic evidence review for the us preventive services task force.** Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2014.

MADHAVAN, G. R. *et al.* Synthesis and biological activity of novel pyrimidinone Containing thiazolidinedione derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.2671 2680, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00107-4)

MALACHIAS, M. *et al.* Capítulo 7 – Tratamento Medicamentoso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1–83, 2016.

<http://doi.org/10.5935/abc.20160157>

MALAVOLTA, J. L. **Síntese de pirimidinas derivados de 7,7,7- trialo-4-metoxi-6-oxo-4-heptenoato de metila e bi-heterocliclicos trifluormetilados.** 2012.

Dissertação (Mestrado em Química) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MALLOY, B. J. *et al.* α 1-Adrenergic receptor subtypes in human detrusor. **Journal of Urology**, v. 160, n. 3 I, p. 937–943, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)62836-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)62836-2)

MARTI, D. *et al.* Correlation between mRNA levels and functional role of α 1-adrenoceptor subtypes in arteries: Evidence of α 1L as a functional isoform of the α 1A-adrenoceptor. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5 58-5, p. 1923–1932, 2005. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00288.2005>

MARTÍNEZ-SALAS, S. G. *et al.* α 1A-Adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v.27m n.3, p. 137-142, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2007.00403.x>

MARTÍNEZ-SALAS, S. G. *et al.* α 1D-Adrenoceptor regulates the vasopressor action of α 1A-adrenoceptor in mesenteric vascular bed of α 1D-adrenoceptor knockout mice. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 31, n. 3–4, p. 64–71, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2011.00468.x>

MCGRATH, J. C. Evidence for more than one type of post- junctional α -adrenoceptor. **Biochemical Pharmacology**, v.31, p.467-484, 1982. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90147-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90147-2)

MORITA, T. *et al.* Function and distribution of autonomic receptors in canine ureteral smooth muscle. **Neurourology and Urodynamics**, v. 13, n. 3, p. 315–321, 1994. [https://doi.org/10.1002/1520-6777\(1994\)13:3<315::AID-NAU1930130313>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1520-6777(1994)13:3<315::AID-NAU1930130313>3.0.CO;2-G)

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NASU, K. *et al.* Quantification and distribution of α 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: Comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 5, p. 797–803, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15742.x>

NISHI, K. *et al.* Properties of alpha-1-adrenergic receptors in the rat prostate: Effect of experimental diabetes. **Urologia Internationalis**, v. 61, n. 3, p. 147–153, 1998. <https://doi.org/10.1159/000030311>

NOGUEIRA, D. *et al.* Reconhecimento, tratamento e controle da hipertensão arterial: Estudo Pró-Saúde, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 27, n. 2, p. 103–109, 2010. <http://doi.org/10.1590/s1020-49892010000200003>

PIASCIK, M. T.; KUSIAK, J. W.; BARRON, K. W. α 1-Adrenoceptor subtypes and the regulation of peripheral hemodynamics in the conscious rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, n. 2–3, p. 273–278, 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90443-A](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90443-A)

PIASCIK, M. T. *et al.* The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 3, p. 1583-1589, 1995.

PIASCIK, M. T. *et al.* Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: Analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 2, p. 854–868, 1997.

PROUDMAN, R. G. W.; PUPO, A. S.; BAKER, J. G. The affinity and selectivity of α -adrenoceptor antagonists, antidepressants, and antipsychotics for the human α 1A, α 1B, and α 1D-adrenoceptors. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 8, n. 4, p. 1–16, 2020. <https://doi.org/10.1002/prp2.602>

PUPO, A. S. *et al.* Recent updates on GPCR biased agonism. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 49–57, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.031>

QUARESMA, B. M. C. S. *et al.* Revisiting the pharmacodynamic uroselectivity of α 1-adrenergic receptor antagonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 371, n. 1, p. 106–112, 2019. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.260216>

RANISE, A. *et al.* 5-Substituted 2,3-dihydro-6-mercapto-1,3-diphenyl-2-thioxo-4(3H)-pyrimidinones and their 6-(acylthio) derivatives with platelet antiaggregating, antiinflammatory, antiarrhythmic, antihyperlipidemic and other activities. **Farmaco**, v.49, p.551–558, 1994.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, 1993. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

ROKOSH, D. G. *et al.* Distribution of α 1C-adrenergic receptor mRNA in adult-rat tissues by RNase protection assay and comparison with α 1B and α 1D. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 200, n. 3, p. 1177-1184, 1994. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1575>

ROKOSH, D. G. *et al.* Knockout of the α 1A / C-adrenergic receptor subtype The α 1A / C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 14, p. 9474–9479, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.132552699>

SALADINO, R. *et al.* A new and efficient synthesis of substituted 6-[(2' dialkylamino)ethyl] pyrimidine and 4-N,N-dialkyl-6-vinyl- cytosine derivatives and

evaluation of their antirubella activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.10, p.2143–2153, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00077-9)

SCOFIELD, M. *et al.* Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 2, p. 1035-1042, 1995.

SHAPIRO, E. *et al.* The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic benign prostate hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 147, n. 5, p. 1293–1297, 1992. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)37546-8](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)37546-8)

SIGALA, S. *et al.* Alpha 1 adrenoceptor subtypes in human urinary bladder: Sex and regional comparison. **Life Sciences**, v. 76, n. 4, p. 417–427, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.008>

STARKE, K. Comparison of the effects of clonidine on pre-and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 285, n. 2, p. 133-150, 1974.

STEARNS, G. L.; SANDHU, J. S. The Impact of Medical and Surgical Treatment for Benign Prostatic Hypertrophy on Erectile Function. **Current Urology Reports**, v. 16, n. 11, p. 10–14, 2015. <http://doi.org/10.1007/s11934-015-0549-z>

STEERS, W. D.; KIRBY, R. S. Clinical ease of using doxazosin in BPH patients with and without hypertension. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 8, n. 2, p. 152–157, 2005. <http://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500787>

STONE, E. A.; QUARTERMAIN, D. Alpha-1-noradrenergic neurotransmission, corticosterone, and behavioral depression. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1287–1300, 1999. [http://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00234-6](http://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00234-6)

STRINGFELLOW, D. A. Antineoplastic properties of pyrimidinone interferon inducers. **Adv Enzyme Regul**, v.19, p.335–348, 1981. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(81\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0065-2571(81)90023-6).

TATEMACHI, S. *et al.* α 1-adrenoceptor subtype selectivity and organ specificity of silodosin (KMD-3213). **Yakugaku Zasshi**, v. 126, p. 209–216, 2006.

TEMPLE, D. L.; *et al.*; Synthesis of 3,4-dihydro-4-oxothieno[2,3-d]pyrimidine-2 carboxylates, a new series of orally active antiallergy agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.22, p.505–510, 1979. <https://doi.org/10.1021/jm00191a009>

TESTA, R. *et al.* Characterization of α 1-adrenoceptor subtypes in prostate and prostatic urethra of rat, rabbit, dog and man. **European Journal of Pharmacology**, v. 249, n. 3, p. 307–315, 1993. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90527-O](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90527-O)

TORRENS, C. *et al.* Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery

but not conduit artery function in pregnant offspring. **Journal of Physiology**, v. 547, n. 1, p. 77–84, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00077.x>

TROPIA, F. C. *et al.* Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 99–107, 2001. <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2001.11747354>

VROEGOP, S. M. *et al.* Pharmacokinetic properties, induction of interferon, and efficacy of selected 5-halo-6-phenyl pyrimidinones, bropridine analogues, in a model of severe experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Journal of Immunopharmacology**, v.21, p.647-662, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(99\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0192-0561(99)00040-5)

WALDEN, P. D. *et al.* Localization of mRNA and receptor binding sites for the $\alpha(1a)$ -adrenoceptor subtype in the rat, monkey and human urinary bladder and prostate. **Journal of Urology**, v. 157, n. 3, p. 1032–1038, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)65136-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)65136-X)

WHITE, D. C.; *et al.* Synthesis and anticonvulsant evaluation of some new 2 substituted-3-arylpyrido[2,3-d]pyrimidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdã, v.12, p.5711-5717, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.068>

WOODARD, T. J. *et al.* Management of Benign Prostatic Hyperplasia in Older Adults. **Consultant Pharmacist**, v. 31, n. 8, p. 412–424, 2016. <http://doi.org/10.4140/TCP.n.2016.412>

YUAN, J. *et al.* The efficacy and safety of alpha-1 blockers for benign prostatic hyperplasia: An overview of 15 systematic reviews. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. 3, p. 279–287, 2013. <http://doi.org/10.1185/03007995.2013.766594>

ZANCHETTI, A. Summary of prazosin lipid studies. **The American Journal of Medicine**, v. 76, n. 2 PART A, p. 122–124, 1984. [http://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90970-7](http://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90970-7)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 02 de março de 2021

Ofício nº 79/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Alice Valença Araújo
 Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
 processo nº0072/2020

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da atividade antagonista de compostos contendo o anel de pirimidinona sobre os receptores α -adrenérgicos e a influência da restrição proteica em suas respostasCentro”. registrado com o nº0072/2020 sob a responsabilidade da Prof. Alice Valença Araújo Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 23/02/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2021 a 20/03/2024
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênico /Camundongos heterogênico
Nº de animais	126
Peso/idade	200-300g (Ratos heterogênico) 35-45g/ (Camundongos heterogênico) 3-2 meses
Sexo	Macho (92) e Femea (34)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Recife - UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Centro Acadêmico de Vitória (CAV).

Atenciosamente



Prof. Sebastião R. F. Silva
 -Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691