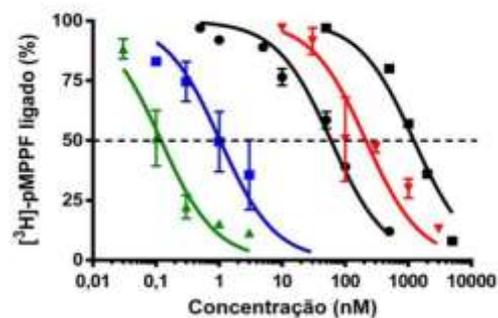
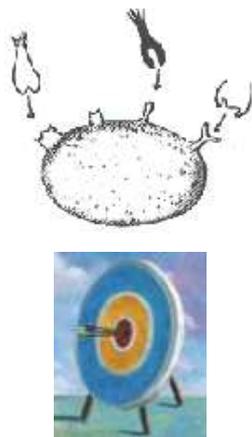


François Noël

ENSAIOS DE *BINDING*:

Fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos



1^a edição

Rio de Janeiro

François Germain Noël

2017

ENSAIOS DE *BINDING*:

**Fundamentos teóricos, aspectos práticos e
aplicações no desenvolvimento de fármacos**

François Noël, PhD

Professor Titular

Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

<http://francoisnoelfarmac.wixsite.com/fnoel>

1ª Edição

Rio de Janeiro

François Germain Noël

Outubro 2017

N765

Noël, François Germain

Ensaio de binding [recurso eletrônico]: fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos / François Germain Noël.
– Rio de Janeiro : François Germain Noël, 2017.

2,82 Mb ; il.

Formato : PDF.

Requisitos : Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso : World Wide Web

Inclui bibliografia.

ISBN 978-85-923439-0-3 (recurso eletrônico)

1. Farmacologia. 2. Avaliação Pré-Clínica de Medicamentos. 3. Sítios de Ligação. 4. Receptores de Droga. I. Título.

CDD 615

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS



Este livro é dedicado à memória dos meus avós maternos, “Paou” e “Mami”, e aos meus pais, Gilbert Noël e Liliane Six, que sempre me incentivaram nos meus estudos.

Dedicatória especial a Heloisa, Hugo e Caroline que são os alicerces da minha família no Brasil, e ao Brûlé (o gato).

Agradeço ao professor Luís Eduardo Menezes Quintas (UFRJ) pela cuidadosa revisão do texto, ao Professor João Batista Calixto (CIEnP) pelo prefácio e à Professora Maria Christina Werneck de Avellar (UNIFESP) pelo prefácio e chancela da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE).

PREFÁCIO (1)

O Dr. François Noël, professor titular do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pesquisador com vasta experiência no estudo da Farmacologia quantitativa, notadamente com o emprego da técnica de *binding* (em português conhecida como união específica), discute em um livro com nove capítulos as vantagens e as limitações do emprego da técnica de *binding* em Farmacologia experimental. O livro com edição cuidadosa está escrito em uma linguagem objetiva e de fácil entendimento, recheado de exemplos ilustrativos (gráficos, esquemas, tabelas), quase sempre obtidos de experimentos realizados pelo próprio autor e seus colaboradores.

Inicialmente o autor faz um relato sucinto, porém, representativo sobre os estudos pioneiros que deram origem ao conceito e as bases para a quantificação dos receptores farmacológicos e suas classificações e funções, iniciando por Langley (1875), passando por Hill (1909), Ehrlich (1913), Clark (1933), Stephenson (1956), Paton e Rang (1965) e finalizando com Lefkowitz (1976). Esse último realizou uma verdadeira revolução no campo da farmacologia quantitativa, utilizando a técnica de *binding* acoplada aos estudos de biologia molecular, o que possibilitou a identificação de novos receptores acoplados à proteína G, abrindo caminho para a identificação de novos alvos farmacológicos e o desenvolvimento de inúmeros medicamentos. Por essas descobertas e seus impactos no desenvolvimento de novos medicamentos, Robert J. Lefkowitz do Instituto Médico Howard Hughes e Centro Médico da Duke University, Durham, Carolina do Norte, foi agraciado em 2012 com o premio Nobel de Química.

O primeiro estudo descrevendo o emprego da técnica de *binding* foi realizado por Paton e Rang em 1965 e descreveram a captação de [³H]-atropina no músculo liso intestinal da cobaia. Na década seguinte, o emprego da técnica de *binding* tornou-se uma ferramenta de grande valia para: i) identificar e classificar receptores; ii) estudar mecanismo de ação de drogas; iii) identificar novos alvos terapêuticos, iv) realizar estudos envolvendo a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de novos candidatos a fármacos e v) em função de sua sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e facilidade de uso, a técnica de *binding* tem sido amplamente usada tanto na indústria como na academia para realizar “screening” de grande número de moléculas com o emprego de ensaios de alta capacidade (*High Throughput Screening - HTS*). Todos os aspectos listados acima são muito bem exemplificados e discutidos pelo autor nos vários capítulos do livro e, mais importante, sempre acompanhado das citações clássicas que originaram essas descobertas.

Além da forma simples e clara como o livro foi escrito, o autor teve o cuidado de destacar alguns pontos chaves para o correto emprego da técnica de *binding* que ele classificou como “Dicas”, onde são resumidos os cuidados especiais para aqueles interessados na realização dos experimentos utilizando esta técnica, em especial com relação à interpretação dos dados. Em função dos vários exemplos ilustrativos e citados no livro, da citação dos trabalhos mais importantes nesta área, será possível a partir da leitura do livro e de sua rica bibliografia a padronização da técnica de *binding* em laboratórios brasileiros, mesmo para um pesquisador com poucos conhecimentos na área.

Nos capítulos 7 e 8 o autor faz uma análise cuidadosa e, sobretudo, crítica sobre as metodologias utilizadas para uso da regressão não linear e ajustes de doses e também sobre o emprego dos métodos estatísticos para análise dos principais parâmetros utilizados na técnica de *binding*. Sem dúvida, esses dois capítulos são relevantes para os pesquisadores interessados no uso da técnica. No capítulo 9 o autor menciona o portfólio das técnicas de *binding* padronizadas e disponíveis no Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências

Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Finalizando, o livro **“Técnica de *Binding*: Fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos”** que será lançado pelo professor François Noël, por ocasião da comemoração do aniversário de 50 anos da SBFTE, além de ser muito oportuno e bem vindo, vem preencher uma lacuna importante para os pesquisadores interessados na padronização e no uso desta técnica da farmacologia quantitativa relevante para o estudo do mecanismo de ação de drogas e, sobretudo, para desenvolver novos medicamentos, tendo em vista que não existe na literatura especializada da área uma referência tão completa, atualizada e crítica como a obra cuidadosamente preparada pelo professor François Noël. Além disso, o professor Noël foi muito generoso ao deixar o pdf do livro na forma de e-book no site da SBFTE para ser baixado gratuitamente pelos pesquisadores interessados. Felicito o professor François Noël pela importante iniciativa e pelo tempo dedicado para escrever esse livro por ocasião do aniversário de 50 anos da SBFTE. Com certeza, o livro terá grande interesse e será apreciado pelos pesquisadores brasileiros, não somente os farmacologistas, mas todos aqueles interessados em dominar e utilizar a técnica de *binding*, tanto na academia como nas indústrias com ferramenta para o desenvolvimento de novos medicamentos. Que a iniciativa do professor François Noël possa ser seguida por outros experientes farmacologistas brasileiros, para deixar registrado na forma de livro, suas experiências no campo da Farmacologia e da Terapêutica Experimental.

João B. Calixto

Professor Titular aposentado de Farmacologia da UFSC

Diretor do Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP)

PREFÁCIO (2)



É com muita honra que a Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE) chancela esta obra que o colega, professor e pesquisador François Noël oferece nobremente à nossa SBFTE em celebração do Jubileu de Ouro de sua fundação. Neste livro ***“Técnica de Binding: Fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos”***, o **Prof. François Noël** apresenta em linguagem leve, muito didática e bem humorada, seu entusiasmo sobre os avanços científicos nas últimas décadas sobre interação fármaco-receptor e ferramentas de farmacologia quantitativa. Ao longo da publicação, seus conhecimentos, vivência prática e orientações básicas com ensaios de ligação para o estudo do complexo fármaco-receptor são colocados à disposição com dicas e ilustrações organizadas de forma extremamente didática e usadas como ferramentas que guiam o leitor para o aprendizado das aplicações dessa técnica no processo de descoberta de alvos para o desenvolvimento pré-clínico de novos fármacos, uma área de pesquisa estratégica e de desafio para mais crescimento em nosso país. É transparente durante a leitura dos capítulos o perfil e objetivo do Prof. François Noël de não apenas *“informar”*, mas literalmente *“compartilhar”* sua visão da área e vasto conhecimento acumulado até aqui em sua carreira acadêmico-científica nesse tópico tão relevante da farmacologia e terapêutica experimental. Ganham, portanto, professores, pesquisadores da academia e indústria e estudantes que trabalham ou têm interesse no ensino e pesquisa na área de farmacologia com os ensinamentos deste *“brinde farmacológico”* oferecido a todos pelo Prof. François Noël. Ganha também a SBFTE que, em parceria com o Prof. François Noël, sócio e colaborador da nossa Sociedade de longa data, têm a honra de contribuir para a divulgação e distribuição aberta e gratuita desta importante publicação na página online da SBFTE (<http://www.sbfte.org.br>). Em celebração de 50 anos da nossa sociedade, esta publicação representa também uma contribuição histórica, pois é o **primeiro e-book** a receber chancela no item *“Ensino/Material Didático”* (**Projeto Iniciativas Educacionais SBFTE**), que tem por objetivo incentivar e divulgar instrumentos didático/práticos de alta qualidade, construídos por farmacologistas da nossa sociedade. Vislumbramos com essas ações fomentar a construção de uma cultura de troca permanente de conhecimento e aprendizado, contribuindo para uma Sociedade e comunidade científica mais qualificada e preparada para enfrentar o futuro e o avanço da farmacologia no nosso país. Como ressaltado no prefácio escrito neste livro pelo Prof. João B. Calixto *“Que a iniciativa do Prof. François Noël possa ser seguida por outros experientes farmacologistas brasileiros, para deixar registrado na forma de livro, suas experiências no campo da Farmacologia e da Terapêutica Experimental”*. Parabéns ao Prof. François Noël por esta empreitada, agradecendo a oportunidade de registrar aqui estas palavras. Como Presidente SBFTE, colega e amiga, sinto-me honrada e orgulhosa de cumprimentá-lo por obra de tão elevado gabarito e que certamente se tornará fonte de referência na nossa comunidade científica. Com muita honra, a SBFTE oficializará o lançamento deste e-book nas ações de Comemoração dos 50 anos SBFTE a serem apresentadas no 49º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, a ser realizado em Outubro, 2017, na cidade de Ribeirão Preto, SP.

Maria Christina W. Avellar (UNIFESP-Escola Paulista de Medicina)
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental
(SBFTE), Gestão 2015-2017

APRESENTAÇÃO

“Não é a paisagem que é pequena, é a janela através da qual olhamos para ela”
provérbio tibetano

Desde que foi cunhada por Langley em 1875, a noção de receptor se tornou central para a Farmacologia, disciplina que se tornou quantitativa após uma abordagem matemática da interação fármaco-receptor (Hill, 1910; Clark, 1933). A farmacologia quantitativa, inicialmente baseada em medidas de efeitos, pôde endereçar diretamente o estudo da interação fármaco-receptor graças ao surgimento da técnica de *binding* (ligação com ligante marcado radioativamente) em meados dos anos 1970. Mais recentemente, com a clonagem do primeiro receptor de membrana plasmática (Devillers-Thiery e cols., 1983) e o estudo estrutural de receptores por meio de difração de raios-X de cristais obtidos com receptores livres ou complexados a um ligante (Rasmussen e cols., 2007; 2011), o estudo da interação fármaco-receptor ganhou novas ferramentas.

Apaixonado por este tema, decidi tentar aproveitar minha experiência de mais de 35 anos no uso da técnica de *binding* para oferecer uma fonte de informações teóricas e práticas sobre esta técnica clássica, e ainda muito atual, para o estudo da interação fármaco-receptor. Visando atingir um público amplo, decidi disponibilizar um texto em português na forma de *e-book* que pode ser baixado gratuitamente no site da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE).

Dentro deste espírito, discutirei os ensaios de ligação clássicos (diretos, com fármaco de interesse marcado radioativamente, e indiretos, de competição), mas também ensaios mais “sofisticados” para avaliar cinética (tempo de residência), alosterismo e eficácia intrínseca, por exemplo. Para cada ensaio, oferecerei exemplos e ilustrarei o seu campo de aplicação com particular foco no processo de descoberta e desenvolvimento pré-clínico de novos candidatos a fármacos.

Ao longo do texto, utilizarei a nomenclatura e formalismo recomendados pela IUPHAR (Neubig e cols., 2003).

Esperando que este livro possa ser útil para seus experimentos e/ou a interpretação de artigos utilizando estas técnicas, lhes desejo uma boa leitura.

Rio de Janeiro, outubro, 2017
François Noël

SUMÁRIO

1. INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR
 - 1.1. Modelo e parâmetros que caracterizam a ligação de um fármaco ao receptor e à produção de efeito
 - 1.2. Técnica de *binding*: aspectos históricos

2. O PAPEL DOS ENSAIOS DE *BINDING* (ALVO-DIRIGIDO) NO PROCESSO DE DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS
 - 2.1. Introdução
 - 2.2. Ensaio alvo-dirigido ou fenotípico?

3. METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO COMPLEXO FÁRMACO-RECEPTOR

4. ENSAIO DE LIGAÇÃO DIRETO
 - 4.1. Introdução
 - 4.2. Aspectos práticos
 - 4.2.1. O radioligante
 - 4.2.2. Fonte do receptor
 - 4.2.3. Meio e condições de incubação
 - 4.2.4. Separação do radioligante ligado e livre ("*Bound – Free*")
 - 4.2.5. Determinação da ligação inespecífica (não específica)
 - 4.2.5.1. Conceito
 - 4.2.5.2. Natureza da ligação inespecífica (NS)
 - 4.2.5.3. Lavagem e uso de anti-adsorventes
 - 4.2.6. Determinação da quantidade de proteína
 - 4.3. Ensaio de saturação no equilíbrio
 - 4.3.1. Curva de saturação simples (uma população homogénea de sítios de ligação): representação gráfica e análise
 - 4.3.2. Curvas de saturação atípicas (gráficos de Scatchard não lineares)
 - 4.3.2.1. Gráficos de Scatchard côncavos
 - 4.3.2.2. Gráficos de Scatchard convexos
 - 4.3.3. Ensaios cinéticos: k_{+1} e k_{-1}
 - 4.3.4. Reações bimoleculares simples (uma população de sítios de ligação)
 - 4.3.4.1. Cinética de associação
 - 4.3.4.2. Ensaio de dissociação
 - 4.3.5. Curvas de dissociação atípicas
 - 4.3.5.1. Multiplicidade de sítios de ligação
 - 4.3.5.2. Cooperatividade

- 4.4. Aplicações
 - 4.4.1. Desenvolvimento de fármacos: avaliação do mecanismo de ação molecular de novos candidatos a fármaco
 - 4.4.2. Avaliação de alterações de afinidade e/ou número de receptores: estudo em doenças, ontogenia e envelhecimento ou distribuição no organismo.
- 5. ENSAIO DE LIGAÇÃO INDIRETO (com substâncias testes não marcadas)
 - 5.1. Introdução
 - 5.2. Ensaio de competição no equilíbrio: determinação de K_i
 - 5.2.1. Fundamentos teóricos
 - 5.2.2. Aspectos práticos
 - 5.2.2.1. Tempo para alcançar o equilíbrio na presença de competidor
 - 5.2.2.2. Curvas atípicas e coeficiente de Hill
 - 5.2.3. Aplicações
 - 5.2.3.1. Descoberta e desenvolvimento de fármacos
 - 5.2.3.1.1. *Screening*
 - 5.2.3.1.2. Relação Estrutura-Atividade (REA)
 - 5.2.3.1.3. Validação de modelos de *docking* para triagem virtual
 - 5.2.3.1.4. Avaliação de seletividade
 - 5.2.3.2. Mecanismo molecular de ação: reversibilidade da ligação
 - 5.3. Ensaio de cinética: determinação do tempo de residência
 - 5.3.1. Fundamentos teóricos
 - 5.3.2. Aspectos práticos
 - 5.3.3. Aplicações
 - 5.3.3.1. Descoberta de novos fármacos
- 6. ENSAIOS MENOS CLÁSSICOS e APLICAÇÕES
 - 6.1. Eficácia intrínseca (*binding* funcional)
 - 6.1.1. GPCR – Receptores acoplados à proteína G
 - 6.1.1.1. Princípio
 - 6.1.1.2. *GTP-shift*
 - 6.1.1.3. Razão de K_i
 - 6.1.1.4. *Binding* de [35 S]- GTP γ S
 - 6.1.1.5. Na^+ -*shift*
 - 6.1.2. Receptores ionotrópicos
 - 6.1.2.1. Receptor benzodiazepínico e GABA-*shift*
 - 6.2. Alosterismo
 - 6.2.1. Fundamento teórico
 - 6.2.2. Aspecto prático
 - 6.2.2.1. Tipo de ensaios
 - 6.2.2.2. Escolha do radioligante e da fonte de receptor (espécie)

- 6.3. Determinantes termodinâmicos da afinidade: Δh e Δs
 - 6.3.1. Princípio
 - 6.3.2. Aspecto prático
 - 6.3.3. Aplicações
 - 6.3.3.1. Desenvolvimento de fármacos
 - 6.3.3.2. Discriminação termodinâmica
- 6.4. Caracterização farmacológica de receptores ortólogos
 - 6.4.1. Princípio
 - 6.4.2. Aspecto prático
 - 6.4.3. Aplicações
- 7. REGRESSÃO NÃO LINEAR E AJUSTE DE CURVAS
 - 7.1. Ajuste de curvas: princípio
 - 7.2. Equação linear e regressão linear
 - 7.3. Equação não linear
 - 7.3.1. Linearização dos dados e regressão linear
 - 7.3.2. Regressão não linear
 - 7.3.2.1. Regras de boas práticas para ajuste de curvas concentração-efeito
 - 7.3.2.2. Qualidade do ajuste
- 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA E APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS
 - 8.1. E_{max} , B_{max}
 - 8.2. CE_{50} , CI_{50} , K_i
- 9. PORTFÓLIO DE ENSAIOS DO LFBM
 - 9.1. Introdução
 - 9.2. Acessibilidade
 - 9.3. Catálogo de ensaios e exemplo
- 10. REFERÊNCIAS

Capítulo 1. INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”

Albert Einstein

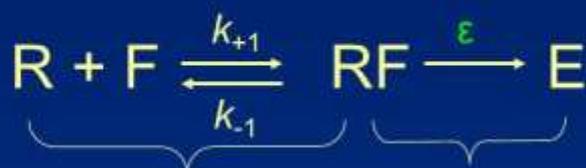
Neste capítulo, reveremos alguns conceitos da interação entre fármacos e receptores, pelo menos os básicos que são considerados indispensáveis para fundamentar os ensaios de *binding*. Para quem desejar mais detalhes, recomendo algumas boas revisões disponíveis na literatura sobre farmacodinâmica quantitativa, a evolução de alguns conceitos e seus aspectos históricos (Colquhoun, 2006; Rang, 2006; Kenakin, 2013; Bylund & Toews, 2014).

1.1. MODELO E PARÂMETROS QUE CARACTERIZAM A LIGAÇÃO DE UM FÁRMACO AO RECEPTOR E À PRODUÇÃO DE EFEITO

A **Figura 1** apresenta de forma simplificada a sequência de eventos entre a ligação de um fármaco (F) ao seu receptor (R) e a produção de efeito. Apesar da sua simplicidade, este esquema apresenta de forma didática a diferença entre a medida da formação do complexo Receptor-Fármaco (RF), geralmente obtida através de ensaio de *binding*, e a medida do efeito resultante (E), obtida em ensaio de farmacologia funcional, que chamaria de “clássica”, pois era o único tipo de ensaio disponível até o surgimento da técnica de *binding* em meados dos anos 1970.

Através dos ensaios de *binding* de saturação, detalhados no **Capítulo 4**, podemos medir diretamente a quantidade de complexo fármaco-receptor formado e assim calcular o número de receptores ($[R]_{total}$) presentes numa preparação (por exemplo, em pmoles/mg proteína) e a constante de equilíbrio de dissociação (K_d), que representa o inverso da constante de associação (K_a). Assim sendo, quanto menor o valor de K_d , maior a afinidade do fármaco para o receptor. Em 1909, Hill expressou pela primeira vez de forma quantitativa a ideia de interação fármaco-receptor em termos de reação bimolecular através da equação agora conhecida como “Equação de Hill-Langmuir” para *binding* no equilíbrio, ou seja, quando a velocidade de associação e formação do complexo receptor-fármaco for igual à velocidade de dissociação do complexo (**Figura 1**). O K_d pode ser também definido, e calculado (vide **Capítulo 4.4**), pela razão entre a constante de velocidade de dissociação (k_{-1}) e a constante de velocidade de associação (k_{+1}), como ilustrado na **Figura 1**.

Binding vs Funcional



Afinidade
Binding

Efeito
Farmacologia clássica

$$[RF] = \frac{[R]_{tot} \cdot [F]}{K_d + [F]}$$

Equação 1A

$$E = f \cdot \epsilon \frac{[R]_{tot} \cdot [F]}{K_d + [F]}$$

Equação 1B

$$K_d = k_{-1} / k_{+1}$$

Figura 1. Esquema representando a formação de complexo entre um fármaco (F) e seu receptor (R), seguindo uma reação bimolecular simples, e a produção de efeito (E). O esquema enfatiza o desfecho dos estudos de *binding* (concentração de complexos fármaco-receptor formados) e de farmacologia clássica (efeito). As equações caracterizando a ligação do fármaco e a produção de efeito são também representadas, com a terminologia adequada dos parâmetros envolvidos. *Esquerda (Equação 1A)*: Relação entre formação do complexo Receptor-Fármaco ([RF]), concentração do fármaco e parâmetros caracterizando a concentração de receptores ([R]_{tot}) e a afinidade do fármaco, conforme equação de Hill-Langmuir para ligação reversível, caracterizando a ocupação dos receptores. K_d = constante de equilíbrio de dissociação (inversamente proporcional à afinidade); constantes de velocidade de dissociação (k_{-1}) e de associação (k_{+1}). *Direita (Equação 1B)*: Relação entre produção de efeito, ocupação dos receptores e parâmetros correspondendo à eficácia intrínseca do fármaco (ϵ) e à capacidade de amplificação do estímulo inicial (f). Nota-se que dois parâmetros são características do fármaco ([R]_{tot} e K_d) e dois são propriedades do sistema biológico (f e ϵ).

Por outro lado, contrariamente ao que Clark havia inicialmente previsto na sua Teoria da Ocupação (1933), a ocupação de receptores não é condição suficiente para produção de efeito; portanto, a afirmativa de que “O efeito do fármaco é diretamente proporcional à fração de receptores ocupados” não é correta. De fato, os antagonistas são caracterizados pelo fato de se ligarem ao receptor, porém sem provocar efeito próprio (mas, sim, dificultar o efeito de agonistas). É justamente em função desta observação que Stephenson (1956) introduziu o conceito de eficácia intrínseca (ϵ), segundo parâmetro que caracteriza os

fármacos (ao lado da afinidade). Desta forma, Stephenson foi o primeiro a claramente distinguir as duas propriedades farmacodinâmicas fundamentais dos fármacos: sua capacidade de se ligar ao receptor (**afinidade**) e de ativá-lo (**eficácia**) uma vez ligado. Como pode ser visto na equação 1B (Fig. 1), o efeito produzido por um fármaco vai depender do nível de ocupação dos receptores (o que vai depender da sua concentração e afinidade), mas também da sua eficácia intrínseca (se for igual à zero, como no caso dos antagonistas, haverá ligação, mas não efeito). Ademais, o efeito observado dependerá também da amplificação do sinal (f), fator que depende do ambiente celular no qual o receptor está inserido, e não do fármaco. Assim, o efeito do fármaco depende da sua concentração (obedecendo à Lei de Ação das Massas), de duas características do fármaco (afinidade e eficácia intrínseca) e de duas características da célula (número de receptores e capacidade de amplificação do sinal).



Dica 1. Agonistas. Na realidade, a situação é um pouco mais complicada, sobretudo para os agonistas. De fato, como explicado no Capítulo 6.1, para o caso de receptores metabotrópicos (GPCR), a afinidade de agonistas medida em ensaio de *binding* será sempre aparente (“macroscópica”), pois é contaminada pela eficácia, caso não se impeça a formação de complexo ternário “agonista-receptor-proteína G”. O equívoco de Stephenson ao declarar que os dois parâmetros afinidade e eficácia eram independentes foi claramente exposto no modelo de Castillo-Katz (1957, *apud* Changeux & Edelstein, 2011), que esclarecem que a afinidade tal qual é medida em ensaio de *binding* corresponderia, na verdade, à afinidade “macroscópica”, pois depende de duas constantes, correspondendo às duas formas do complexo fármaco-receptor (FR e FR*, sendo R* a forma ativa do receptor) que depende, portanto, da eficácia (capacidade de ativar o receptor).

É importante ressaltar que diferentes modelos foram propostos para descrever a interação fármaco-receptor (ligação e efeito) ao longo da história da Farmacologia, como o modelo operacional de Black e Leff (1983). Por outro lado, durante muito tempo houve coexistência de dois paradigmas (seleção vs. indução) em relação às diferentes conformações que podem assumir os receptores: o modelo de Koshland-Némethy-Filmer (*induced-fit*, ou “ajuste induzido”) considera que o agonista induz uma modificação conformacional do receptor que se torna, então, ativo (de certo modo semelhante ao esquema mostrado na Figura 1), enquanto que o modelo de Monod-Wyman-Changeux, que depois gerou o modelo conhecido como “de dois estados”, considera que o agonista seleciona uma conformação ativa pré-existente. Atualmente, parece prevalecer o modelo de seleção de conformações (Changeux & Edelstein, 2011; Kenakin, 2013).

1.2. TÉCNICA DE *BINDING*: ASPECTOS HISTÓRICOS

Ninguém melhor do que Paul Ehrlich (1913) para enaltecer a importância da ligação do fármaco ao seu receptor para a produção dos seus efeitos, quando cunhou a famosa frase “*corpora non agunt nisi fixata*” (as substâncias não atuam a não ser que se fixem). No escopo deste livro, não posso deixar de referenciar seu caráter visionário quando ilustrou de forma didática o que seria o reconhecimento de substâncias exógenas (toxinas) por estruturas membranares das células (*side chains*, Fig. 2).

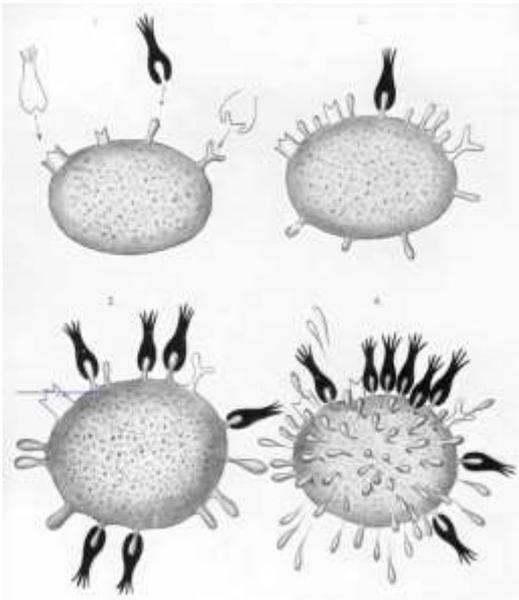


Figura 2. Representação da formação de toxinas e antitoxinas (*side chains*) durante o processo de imunização (Ehrlich, 1899).

Agradeço à The Royal Society (Londres) pela permissão de uso desta Figura.

Apesar desta Figura ter sido inicialmente introduzida em 1899 para explicar um mecanismo de depuração de substâncias tóxicas (lembramos que Ehrlich recebeu o prêmio Nobel por seus trabalhos em Imunologia), ela serve muito bem, até hoje, para ilustrar a interação fármaco-receptor com suas características de complementaridade estrutural, localização majoritariamente membranares e saturabilidade. De fato, após ter inicialmente relutado à ideia de receptor farmacológico introduzida por William Langley desde 1875, Ehrlich aplicou depois seu conceito de “quimiorreceptores” para fármacos (1917), o que o levou a descoberta do Salvarsan®, primeiro quimioterápico para o tratamento da sífilis, razão pela qual é reverenciado até hoje como o “Pai da Quimioterapia”. Seu lema da “bala mágica” (*magic bullet*: para uma determinada doença, deve haver um alvo preferencial a ser modulado por um fármaco seletivo) marcou também de forma importante a indústria farmacêutica e o processo de descoberta de novos fármacos.

A primeira evidência de possibilidade de estudo direto da ligação de um fármaco ao seu receptor foi obtida por Luthi e Waser (1956) utilizando a técnica de autorradiografia com [¹⁴C]-decametônio em diafragma de camundongo (Fig. 3).



Figura 3. Autorradiografia de diafragma de camundongo com $[^{14}\text{C}]$ -decametônio (Luthi & Waser, 1956). Reimpresso com permissão da Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, direitos autorais 1956 (<http://www.nature.com/nature/index.html>).

Dez anos depois, Paton e Rang (1965) realizaram o primeiro estudo quantitativo de *binding* ao medir a captação de $[^3\text{H}]$ -atropina pelo músculo liso intestinal da cobaia. Porém, é nos anos 1970 que se observou uma explosão de trabalhos utilizando a técnica de *binding* para o estudo de receptores, com alta contribuição do grupo do pesquisador laureado com o prêmio Nobel de Química em 2012, Robert Lefkowitz, para o estudo dos receptores adrenérgicos. É também em meados desta década que este grupo estabeleceu os critérios necessários para que a ligação de um radioligante se desse ao nível do receptor fisiológico (Lefkowitz e cols., 1976; vide também [Capítulo 4](#)).

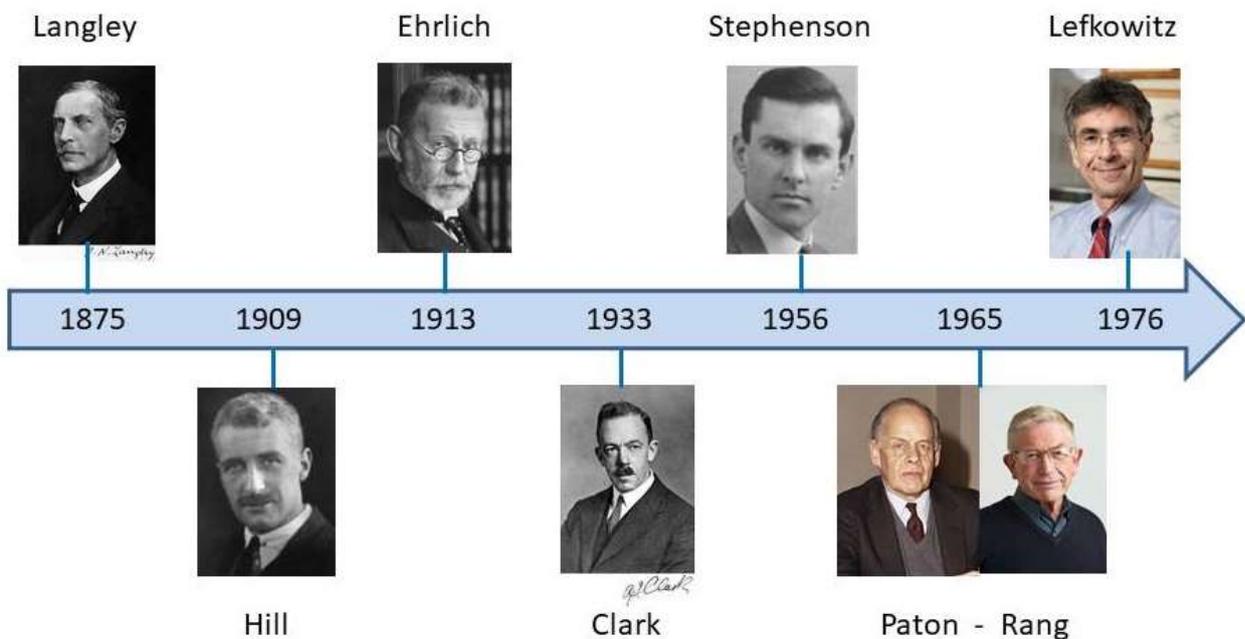


Figura 4. Linha do tempo: pesquisadores com grande contribuição para o estudo dos receptores e os ensaios de *binding*.

Capítulo 2. O PAPEL DOS ENSAIOS DE *BINDING* (ALVO-DIRIGIDO) NO PROCESSO DE DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

“O conhecimento é adquirido através da experiência, todo o resto é apenas informação”
Albert Einstein

2.1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novos fármacos baseia-se na avaliação da atividade biológica de novas substâncias, quer sejam sintéticas ou de origem natural. Apesar do papel histórico que os bioensaios com tecidos/órgãos isolados tiveram na descoberta de novos fármacos (Black, 2010), a partir dos anos 1980 a grande indústria farmacêutica adotou os ensaios de *binding* para a realização do *screening* farmacológico, *i.e.*, a triagem primária de grande número de substâncias (Andrade e cols., 2016). Nestes ensaios, avalia-se a afinidade de uma substância por um receptor quer seja de forma direta quando se tem o fármaco marcado radioativamente (vide [Capítulo 4](#)), ou indiretamente, em ensaio de competição onde uma substância-teste compete com um ligante radioativo de referência para a ocupação do receptor (vide [Capítulo 5](#)). Assim sendo, este tipo de ensaio enquadra-se perfeitamente na filosofia de descoberta de fármacos guiada pelo alvo (alvo-dirigido), de acordo com os ensinamentos de Paul Ehrlich (*“corpora non agunt nisi fixata”* e *“bala mágica”*, vide [Capítulo 1](#)).

As principais vantagens destes ensaios de *binding* são sua sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, facilidade de uso e o fato de não serem limitados por problemas de potência e permeabilidade (Bigott-Hennkens e cols., 2008), além de serem mais rápidos e exigir menores quantidades de substâncias, sem falar dos problemas éticos com o uso de animais de experimentação que caracterizavam os bioensaios clássicos baseados em órgãos isolados. A facilidade de robotização dos ensaios de *binding* foi também uma vantagem fundamental para que a grande indústria farmacêutica possa assegurar um *screening* suficientemente rápido (*High Throughput Screening – HTS*, alta vazão ou rendimento), quando foi pressionada pela velocidade com a qual novas substâncias eram sintetizadas através da química combinatória.

Além de serem importantes para seleção de *hits* (substâncias com atividade em ensaio *in vitro*) os ensaios de *binding* são também essenciais para validar os modelos de *docking*, ferramenta cada vez mais empregada no planejamento racional de fármacos baseada na estrutura do receptor (*Target-Based Drug Discovery*). Da mesma forma, os valores de afinidade de um conjunto de substâncias da mesma série química constituem informações essenciais para realização de estudo de Relação Estrutura-Atividade, tão importante para a otimização de compostos protótipos (*lead compounds*). Vale ressaltar que

os ensaios de *binding* podem também ajudar a elucidar o mecanismo molecular de ação de uma substância (vide [Capítulo 4](#), [Capítulo 5](#), [Capítulo 6](#)).

Além destes ensaios clássicos, ensaios de *binding* mais “sofisticados” podem fornecer informações importantes quanto à eficácia intrínseca de um ligante (*binding* funcional – [Capítulo 6.1.](#)) ou ajudar a identificar um mecanismo de modulação alostérica ([Capítulo 6.2.](#)). Ademais, ensaios de cinética são usados para avaliar o tempo de residência do ligante no receptor, aspecto da interação fármaco-receptor que vem recebendo cada vez mais atenção no processo de desenvolvimento de novos fármacos ([Capítulo 5.3.](#)).

2.2. ENSAIO ALVO-DIRIGIDO OU FENOTÍPICO ?

Quanto à eterna discussão sobre a valia dos diferentes tipos de ensaios a serem usados no processo de desenvolvimento de fármacos, com avaliações indo do nível molecular (*binding*) ao animal, passando pelos ensaios fenotípicos baseados em células, é importante prestar atenção no ensinamento do “mago” Sir James Black (2010): “Nenhum nível de avaliação é mais informativo do que o outro. Por isso, acredito fortemente que a farmacologia precisa ser estudada em todos os níveis, sendo que a escolha do nível deve ser ditada pela natureza da questão que é feita”. Desta forma, apesar do uso cada vez mais frequente de ensaios baseados em células para *screening* de novos candidatos a fármacos na indústria farmacêutica (Williams & Sewing, 2005), dados recentes mostram que 71% dos novos fármacos introduzidos no mercado em 2011 e 2012 foram descobertos por *screening* baseado no alvo, sendo os 29% restantes através de ensaios fenotípicos (Cumming e cols., 2014). Mesmo quando se opta pelo uso de ensaio fenotípico para *screening*, uma vez selecionado um novo candidato a fármaco, sempre haverá necessidade de definir seu alvo molecular, sendo então usada a técnica de *binding* para elucidar o mecanismo molecular e não mais como ferramenta para seleção de *hits*.

O uso cada vez maior de ensaios fenotípicos baseados em células, ocorrido a partir dos anos 2000 na indústria farmacêutica (Williams & Sewing, 2005), se deu em função de algumas vantagens como a capacidade de avaliar a eficácia e não somente a afinidade de um composto (agonista vs. antagonista) já que a *função* de receptor pode ser medida, o que não ocorreria com os ensaios de *binding*, pelo menos na sua configuração básica (vide discussão sobre ensaios de *binding* funcionais no [Capítulo 6.1.](#)). Outro fator que impulsionou esta mudança foi a adaptação de metodologias de manuseio de culturas de células que permitissem um *screening* do tipo HTS. Por outro lado, há de considerar algumas limitações na questão da translacionalidade, já que existem diferenças entre a bioquímica *funcional* de células em cultura e de células *in situ*, e certamente mais de células de um organismo doente. Quanto ao uso de células recombinantes (HEK, CHO) com superexpressão de receptores, outra ferramenta de interesse e cada vez mais empregada, sabemos que o

ambiente celular diferente, com falta de proteínas “parceiras”, pode levar a respostas diferentes daquelas que seriam observadas *in vivo*.



Dica 2. Qual seria o papel desta técnica de *binding* em laboratórios de pesquisa na Universidade ?

Além de excessivamente caros para a realidade acadêmica, os ensaios de *binding* robotizados do jeito que são feitos na indústria (HTS) apresentam falhas potenciais, sobretudo falsos negativos, o que pode ocorrer com maior frequência no caso de receptores ionotrópicos que possuem vários sítios moduladores (Noël e cols., 2001). Tal situação pode ser particularmente prejudicial quando o número de substâncias a serem testadas é relativamente pequeno como no caso de moléculas desenhadas racionalmente em laboratórios universitários, quer seja por técnicas de modelagem molecular fundamentadas na estrutura tridimensional do receptor ou por bioisomerismo, por exemplo (Barreiro & Fraga, 2008).

Capítulo 3. METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO COMPLEXO FÁRMACO-RECEPTOR

“A chave para todas as ciências é sem dúvida o ponto de interrogação; devemos a maioria das grandes descobertas ao “como?” ”

Honoré de Balzac

Métodos *in silico* baseados em estrutura, quer seja cristalográfica ou determinada por homologia, são cada vez mais bem aceitos nas primeiras etapas de projetos de desenvolvimento de fármacos como forma de filtrar quimiotecas, físicas ou virtuais.

No que diz respeito à avaliação direta da interação entre um ligante e um receptor, essencial em alguma etapa do processo de descoberta de novos fármacos, observamos uma mudança nas técnicas de detecção ao longo dos últimos anos, havendo tendência em trocar os métodos baseados em radioatividade por métodos baseados em sondas fluorescentes, sobretudo para evitar o problema ambiental de descarte de resíduos radioativos. Assim, uma grande variedade de técnicas foi desenvolvida para medir diferentes aspectos da fluorescência (Fang, 2012). Dos mais populares, podemos citar os ensaios de fluorescência resolvida no tempo (TR), combinada ou não com transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET).

Ademais, outras técnicas alternativas estão sendo empregadas para o estudo da interação fármaco-receptor sem necessidade de marcação do ligante (*label-free*), como a ressonância de plasma de superfície e a microcalorimetria (Fang, 2012; vide **Dica 9**).

Apesar de algumas vantagens oferecidas por estas alternativas, limitações técnicas fazem com que o ensaio clássico de *binding* por filtração continua sendo ainda o método de escolha no *screening* de grande número de candidatos a fármacos (de Jong e cols., 2005), inclusive em empresas prestadoras de serviços como a Eurofins onde a técnica de *binding* com radioligantes é considerada o padrão-ouro para detectar a interação de substâncias com GPCRs (<http://www.eurofins.com/biopharma-services/discovery/services/in-vitro-pharmacology/gpcrs/binding>).

Capítulo 4. ENSAIO DE LIGAÇÃO DIRETO

“A simplicidade é a sofisticação suprema”

Leonardo da Vinci

4.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de *binding* direto é a forma mais fácil de obter informações sobre afinidade e cinética de ligação de um fármaco. A maior limitação é a necessidade de dispor do fármaco marcado radioativamente. Quando o fármaco de interesse já é classicamente usado na literatura em tais estudos, ele pode ser obtido comercialmente com facilidade através de empresas especializadas como a PerkinElmer® (antiga linha da empresa New England Nuclear) e American Radiolabeled Chemicals®, ambas representadas no Brasil por firmas que possuem licença para importação e comercialização de produtos radioativos no país. Caso a substância de interesse seja original, como, por exemplo, um novo candidato a fármaco, a radiomarcagem pode ser encomendada a estas mesmas empresas.

4.2. ASPECTOS PRÁTICOS

Antes de entrar nos fundamentos e aspectos práticos dos ensaios propriamente ditos, irei primeiramente tecer comentários sobre aspectos práticos gerais a respeito do radioligante, das fontes de receptores, das metodologias para separação do radioligante ligado e livre, das condições de incubação e da determinação da ligação inespecífica (Bennett, 1978). Alguns destes aspectos são também ilustrados em um vídeo que apresenta os equipamentos que usamos assim como a sequência de manipulações características de um ensaio de *binding* (vide <https://youtu.be/qyXGVaJW0h0>).

4.2.1. O radioligante

As propriedades gerais desejadas para um radioligante é que ele tenha alta atividade específica (expressa em Ci/mmol) para ter um bom sinal, mesmo se houver poucos complexos fármaco-receptor formados, pureza (para evitar marcação inespecífica), estabilidade química e atividade biológica idêntica à substância nativa, não marcada.

Geralmente se faz uso de ligantes marcados com trítio (^3H), em função das vantagens que tal marcação oferece, como: a atividade biológica da substância não é afetada pela marcação; a atividade específica é, geralmente, suficientemente alta (> 20 Ci/mmol), o radioligante é estável por meses (e até anos, dependendo da substância, na nossa experiência) desde que armazenado apropriadamente. Recomenda-se o armazenamento no frasco e solvente originais e no freezer, à -20°C . O solvente etanol tem certa capacidade de

neutralizar radicais livres e evita o congelamento, pois este aumenta a radiólise do produto. Finalmente, o trítio possui longo tempo de meia-vida radioquímica (> 12 anos).

Apesar de poderem ser usados em certos casos (peptídeos, por exemplo), onde há necessidade de atividade específica muito elevada, ligantes marcados com iodo (^{125}I) são pouco empregados devido aos seguintes problemas: possível diferença de atividade biológica em função da introdução de um átomo na substância de interesse; geração de moléculas marcadas danificadas, alto grau de radiólise e curta meia-vida radioquímica (67 dias).

4.2.2. Fonte do receptor

Durante muito tempo, foram usadas exclusivamente preparações membranares de órgãos de animais de experimentação (sobretudo ratos) como fonte de receptor. A escolha do órgão e, eventualmente, da espécie é norteadas pela distribuição do receptor de interesse, onde se busca um órgão, ou parte dele, no qual o receptor está mais concentrado, permitindo assim a obtenção de uma preparação mais enriquecida no receptor-alvo. No caso do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, por exemplo, decidimos utilizar o hipocampo de rato como fonte de material (Noël e cols., 2014) já que Hall e cols. (1985) haviam mostrado que a ligação específica do [^3H]-8-OH-DPAT, um radioligante seletivo para este subtipo de receptor, era mais elevada do que em outras estruturas cerebrais como córtex, estriado e tronco cerebral. Uma vez escolhido o órgão/tecido, opta-se geralmente por fazer uma preparação membranares a partir do homogenato (caso o receptor seja localizado na membrana plasmática, como em três – ionotrópicos, metabotrópicos e receptores ligados à cinases – das quatro superfamílias de receptores fisiológicos), com o intuito de eliminar células intactas, núcleos, mitocôndrias e outras proteínas solúveis que aumentariam a ligação inespecífica.

Há atualmente uma mudança de paradigma, ao usar como fonte de receptor células transfectadas com cDNA do receptor humano desejado. Apesar do maior custo e sofisticação técnica necessários para produzir a preparação, esta técnica está sendo cada vez usada não somente para fornecer material para estudos de *binding* como também para estudos fenotípicos com avaliação de diversos tipos de efeitos (celular, segundo mensageiro, etc.). A grande vantagem é de poder trabalhar com um único subtipo de receptor, de origem humana, além de poder ter altos níveis de expressão, bem acima dos fisiológicos. De fato, enquanto o estudo de receptores como o 5-HT_{1A} é facilmente realizado em preparação de hipocampo de rato onde ele se encontra em alta densidade, com o uso de um radioligante seletivo para este subtipo, é impossível traçar a mesma estratégia quando o receptor de interesse é um subtipo pouco expresso e minoritário em relação aos outros subtipos, como é o caso do receptor D₄, por exemplo, para o qual não existe radioligante suficientemente seletivo. No caso destas células, é também preferível usar uma preparação membranares em vez de um homogenato.

4.2.3. Meio e condições de incubação

A priori, o ideal seria realizar os estudos de *binding* em condições mais próximas possíveis do contexto fisiológico, quer seja de pH, temperatura e composição do meio.

pH: Exceto para um eventual ensaio de ligação a receptores intracelulares, quando se pode escolher um pH de 6,8, o pH é normalmente ajustado para 7,4 quando se estuda receptores inseridos na membrana plasmática.

Temperatura: enquanto parece óbvia a escolha pela temperatura de 37°C (*a priori*, ideal para o estudo de receptores humanos ou de organismos homeotérmicos), podemos observar que vários trabalhos foram realizados numa temperatura de 25°C (temperatura “ambiente”) ou mesmo de 4°C, geralmente sem discussão sobre a razão desta escolha. A temperatura ambiente (pouco rigorosa como informação e de dúvida reprodutibilidade) talvez se devesse à maior facilidade de trabalhar, sobretudo quando se usa placas de 96 poços (ou mais, em HTS). A temperatura de 4°C poderia se justificar no caso de substâncias (como neurotransmissores) que podem ser substratos de transportadores ativos os quais são muito sensíveis à temperatura: assim, baixando a temperatura se evitaria uma marcação dos transportadores, favorecendo assim a ligação aos receptores. Em outros casos, esta baixa temperatura foi usada porque a afinidade dos fármacos era maior nesta temperatura, como no caso da ligação de benzodiazepinas ao receptor GABA_A (Speth e cols., 1979). Caso não se use a temperatura fisiológica, é importante estar ciente de que a afinidade pode mudar em função da temperatura, e de forma diferente para diversos fármacos (vide Capítulo 6.3.). Por outro lado, podemos escolher realizar experimentos em diferentes temperaturas para ganhar informações sobre a termodinâmica da reação, como discutido mais adiante (vide Capítulo 6.3.).

Meio de incubação: na prática, a questão do meio fisiológico não é tão simples já que trabalhamos com suspensão de pedaços de membranas, não havendo, portanto, distinção entre um meio intracelular e extracelular. Por esta razão, muitos experimentos de *binding* são realizados em meios artificiais contendo somente um tampão (ex: Tris-HCl 50 mM), eventualmente com algum íon e um agente quelante como o EGTA. A questão dos íons será abordada em capítulo posterior tendo em vista sua importância nos ensaios de *binding* funcional (vide Capítulo 6.1.). Outro aspecto interessante neste quesito é o fato do íon Na⁺ facilitar a ligação de diferentes neurotransmissores ao sistema de captação, sendo assim imprescindível caso se queira avaliar a ligação a estes transportadores ou, ao contrário, indesejável se o alvo do estudo for o receptor (neste caso, iremos preferir dificultar a ligação do fármaco ao transportador). Ademais, o íon Na⁺ pode influenciar diferentemente a ligação de agonistas e antagonistas de GPCR (vide Capítulo 6.1.).

4.2.4. Separação do radioligante ligado e livre (“Bound – Free”)

Pelo método clássico de ensaio de *binding* com radioligante, uma etapa importante é a separação do ligante ligado ao receptor (a ser quantificado) do ligante livre (que sempre será em excesso – vide Dica 3). Nesta etapa, deve-se ter cuidado para que a separação seja

completa e rápida para evitar que o complexo radioligante-receptor se dissocia, já que a reação é reversível.

O método mais utilizado e considerado como padrão-ouro é da filtração a vácuo (Fig. 5), pois permite uma lavagem eficiente e rápida (em poucos segundos, por exemplo, com 3 x 5 ml de tampão). Ademais, o uso de tampão gelado irá diminuir a velocidade de dissociação do complexo radioligante-receptor. Por outro lado, o método de centrifugação é muito mais trabalhoso e menos eficiente, havendo a possibilidade de sequestro de moléculas de radioligante livre dentro do *pellet*, que será depois resuspenso e submetido à contagem de radioatividade. Assim sendo, esta opção de técnica de separação somente é usada em casos muito particulares como dissociação extremamente rápida do complexo fármaco-receptor ou alta ligação inespecífica ao filtro.

Mais recentemente, apareceram ensaios como o “*Scintillation Proximity Assay*” que não necessitam de separação física do radioligante livre. Infelizmente, esta técnica é mais cara.

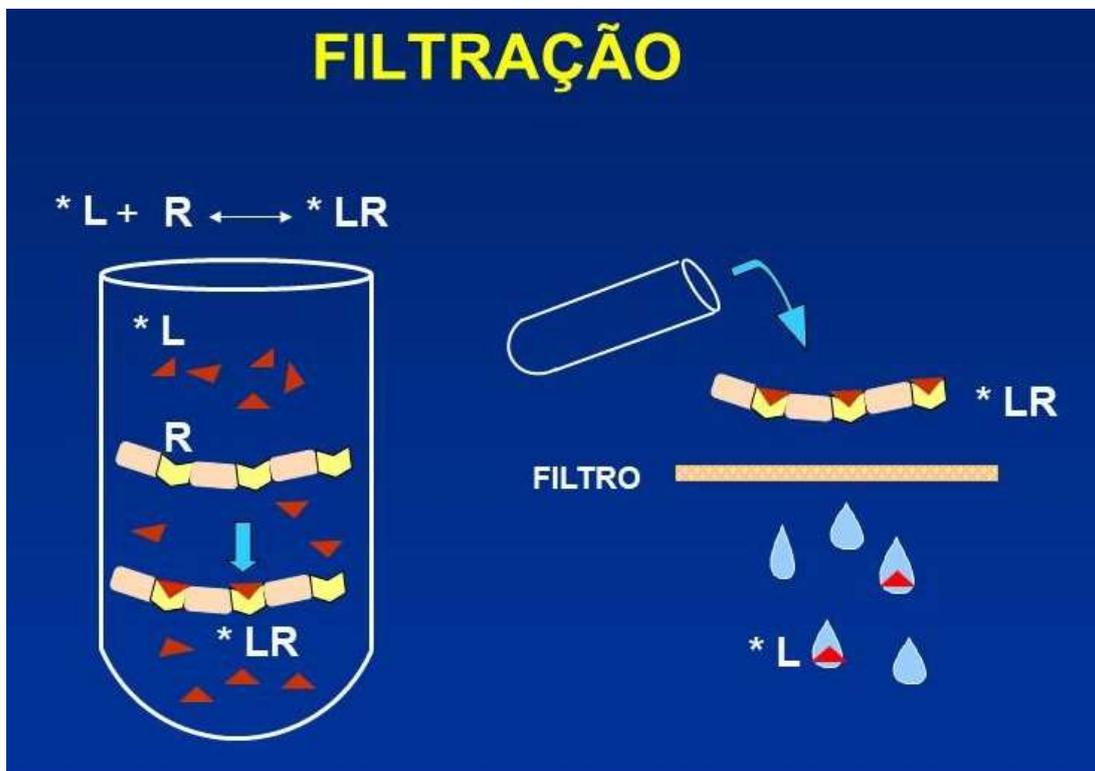


Figura 5. Esquema ilustrando o processo de incubação e filtração a vácuo para separar o complexo receptor (R) - radioligante (*L) (*LR, retido no filtro) do radioligante livre (*L).

4.2.5. Determinação da ligação inespecífica (não específica)

4.2.5.1. Conceito

Além de se ligar ao receptor (sinal a ser medido), o radioligante é capaz de se ligar de forma inespecífica a componentes biológicos da preparação (ou até aos filtros). Assim, como em qualquer medida, o valor bruto deve ser diminuído de um valor “basal” para se obter o valor

do sinal específico que corresponde ao fenômeno estudado (ligação ao receptor), conforme a seguinte equação:

$$T = S + NS$$

Equação 2

Onde: **T** = ligação total (“Total”), **S** = ligação específica (“Specific”) ao receptor e **NS** = ligação inespecífica (ou “Non Specific”).

A ligação inespecífica é medida na presença de um excesso de ligante não radioativo que se liga ao mesmo receptor (e mesmo sítio de ligação) que o radioligante. Idealmente este competidor deve ser uma substância quimicamente diferente do próprio ligante marcado e deve ser usado em concentração suficientemente elevada (pelo menos 100 vezes seu K_d), para ter certeza de ocupar todos os receptores e assim assegurar que a radioatividade remanescente corresponde somente à ligação inespecífica (aquela que não corresponde a uma ligação ao receptor). Este procedimento tem como base o fato da ligação ao receptor ser, por natureza, saturável e, portanto, sujeita à competição que se fará obedecendo à Lei de Ação das Massas (concentrações relativas dos competidores) assim como à relação entre as afinidades relativas dos competidores. Por outro lado, a ligação inespecífica é considerada como sendo não saturável, impedindo assim que o competidor não marcado possa deslocar o radioligante destes sítios (Fig. 6).

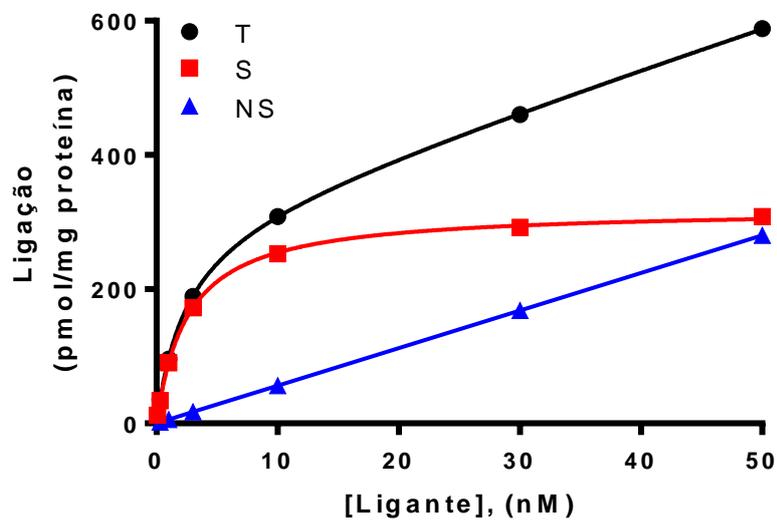


Figura 6. Experimento de saturação. A ligação específica ao receptor (ligação saturável, S) é determinada ao subtrair ponto a ponto a ligação inespecífica (NS, não saturável) da ligação total (T).

4.2.5.2. Natureza da ligação inespecífica (NS)

O valor da ligação inespecífica pode variar muito em função das características químicas do radioligante, como, por exemplo, sua lipofilicidade. De fato, a ligação inespecífica aos componentes biológicos da preparação (e.g., fosfolipídios) é geralmente maior com os

radioligantes mais lipossolúveis. Outro fator que pode contribuir para o valor da ligação inespecífica é o radioligante livre que não foi lavado eficientemente, ou mesmo que ficou ligado ao filtro.

4.2.5.3. Lavagem e uso de anti-adsorventes

Para diminuir o valor da ligação inespecífica, recomenda-se lavar o filtro várias vezes com pequeno volume de tampão gelado (geralmente algo como 3 x 4-5 ml). Caso o valor da ligação inespecífica seja alto, pode-se tentar diminuir a ligação inespecífica ao filtro. Como usamos geralmente filtros de fibras de vidro (material com cargas negativas), substâncias carregadas positivamente podem ficar adsorvidas no próprio filtro. Neste caso, o tratamento dos filtros com uma solução de polietilenoimina (PEI) a 0,5% neutralizará estas cargas e diminuirá o componente da ligação inespecífica proveniente da ligação ao filtro.

4.2.6. **Determinação da quantidade de proteína**

Na fase de validação do método, vale a pena verificar a capacidade máxima de proteína que se pode filtrar. De fato, esta quantidade máxima irá variar em função da superfície do filtro (unidades de filtração clássicas acomodam filtros com diâmetro de 24 a 25 mm, muito maior do que em placas de 96 poços). Ademais, esta capacidade de retenção varia também muito em função do tipo de filtro de fibras de vidro, como sua espessura e trama: com filtros do tipo GF/B da Whatman® podemos usar uma quantidade de proteínas um pouco maior do que com filtros do tipo GF/C, por exemplo.

No caso de filtros de nitrocelulose (pouco usados para experimentos de *binding*), é a porosidade dos mesmos que determina a capacidade de retenção (muito menor).

4.3. ENSAIO DE SATURAÇÃO NO EQUILÍBRIO

A determinação da afinidade de um ligante ao seu receptor e do número de receptores em uma preparação se faz através do experimento de saturação, no qual se aumenta a concentração do ligante mantendo-se uma quantidade fixa de proteína. Para poder aplicar a equação de Hill-Langmuir (vide [Figura 1](#)), é imprescindível que tal experimento seja feito no equilíbrio. Assim sendo, deve se realizar primeiramente um experimento avaliando a ligação do radioligante em função do tempo (*time-course*), como ilustrado na Figura 7, para se determinar o tempo a ser escolhido para o experimento de saturação. Nota-se que devemos utilizar uma baixa concentração de radioligante para este ensaio de cinética (idealmente a menor concentração a ser usada no ensaio de saturação), já que a velocidade com a qual se alcança o equilíbrio aumenta com a concentração.

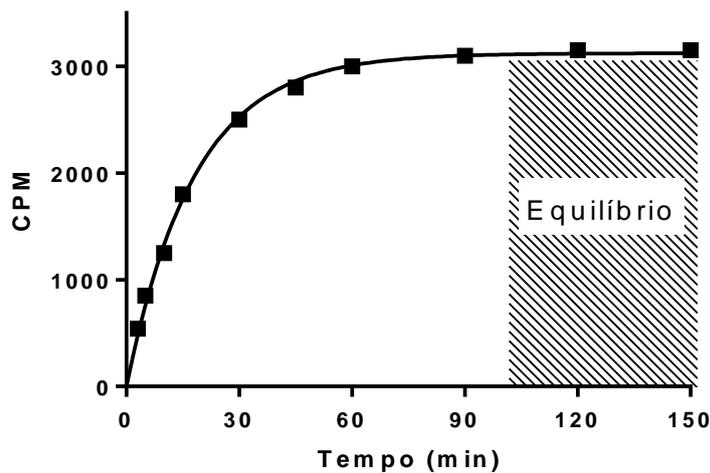


Figura 7. Evolução temporal da ligação específica (*Time-course*).

O experimento de saturação é feito ao aumentar a concentração do radioligante, respeitando-se a progressão logarítmica tradicionalmente usada em farmacologia (ex: 1, 3, 10, 30 nM, etc.). Nota-se que é necessário avaliar o valor da ligação inespecífica para cada concentração de radioligante usada. Alternativamente, podemos utilizar um método de saturação por diluição isotópica (*cold saturation binding study*) quando a concentração do radioligante é fixa, mas adicionamos concentrações crescentes do ligante não marcado para variar a concentração total do ligante (Bigott-Hennkens e cols., 2008). Este procedimento permite uma grande economia de radioligante, ainda mais porque só há uma concentração de radioligante a ser avaliada quanto à ligação inespecífica. Esta diminuição do número de “tubos” para se avaliar a ligação inespecífica diminui também drasticamente a quantidade de preparação necessária, o que é muito relevante quando se tem pouco material biológico, como no caso de pequenos parasitos, por exemplo (Mendonça-Silva e cols., 2002), ou de células transfectadas (caras em termos de custo se importadas ou em termos de trabalho se transfectadas e mantidas no laboratório). Nota-se que sempre usamos esta estratégia de diluição isotópica no meu laboratório.



Dica 3. Zona A. Idealmente, o estudo de ligação deve ocorrer na chamada zona A, onde menos de 10% do radioligante está ligado no equilíbrio, para que haja mínima alteração da concentração do radioligante livre no decorrer da incubação. Desta forma, podemos considerar que a concentração livre do radioligante continua igual à concentração nominal introduzida no meio no início da reação, durante todo o experimento. Temos que ter cuidado se usarmos concentrações elevadas de receptor ou volumes pequenos de meio de incubação. O problema ocorre frequentemente com radioligante de alta afinidade (< 1 nM), quando se deve fazer um cálculo simples de qual é a fração do radioligante livre no final do experimento. Para tanto, é só verificar a quantidade de CPM (*Counts Per Minute*) do tubo total que foi recuperada no filtro e dividir pela quantidade de CPM que foi colocada no tubo (geralmente calculada através da medida de CPM numa alíquota do meio contendo o radioligante, antes da adição da proteína). Caso haja mais de 10% de radioligante ligado ao

receptor no equilíbrio, a concentração de radioligante livre será menor do que a planejada, e se subestimar a constante de dissociação, a não ser que se faça uma correção para cada concentração.

Nota-se que a problemática pode ser maior nos estudos de HTS, quando se usa placas de 384 ou mesmo de 1536 poços, já que a capacidade (volume) dos poços é mais limitada (até cerca de 200 μ l para placas de 384 poços e poucas dezenas de μ l para placas de 1536 poços).

Para respeitar a regra geral de haver pelo menos três concentrações para cada parâmetro (Kenkin, 2009), o número de concentrações deveria ser ≥ 6 , sendo recomendado pelo menos 3 concentrações abaixo e 3 acima do K_d e uma igual ao K_d . Como pode se ver na Figura 8, onde foi feita uma simulação de curva de saturação para ligante com K_d de 2,5 nM, o uso destas concentrações permite uma boa avaliação da curva tanto na parte inferior como superior.

4.3.1. Curva de saturação simples (uma população homogênea de sítios de ligação): representação gráfica e análise

Em termos de representação gráfica, os dados de saturação obedecendo à equação de Hill-Langmuir (vide Figura 1) podem ser representados na forma de curvas concentração-ligação, aos moldes das clássicas curvas concentração-efeito, quer seja usando uma escala aritmética (Fig. 8A) ou logarítmica (Fig. 8B) para as concentrações A e B estão tímidos no gráfico, mal dá para perceber.

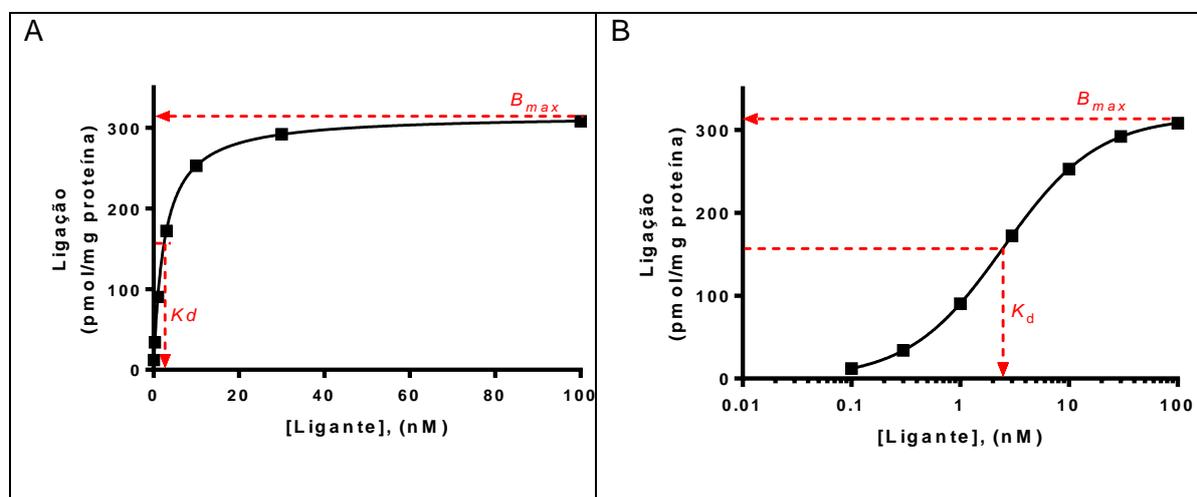


Figura 8. Análise de dados de saturação na presença de uma única população de receptores. Dados teóricos foram gerados utilizando a equação de Hill-Langmuir (vide Figura 1, Equação 1A) e os seguintes parâmetros: $B_{max} = 316$ pmol/mg proteína e $K_d = 2,5$ nM. Notem que as curvas se apresentam como hipérbole retangular (A) ou sigmoide (B), dependendo da escala usada na abscissa (aritmética ou logarítmica, respectivamente). As curvas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01.

Outra representação, conhecida como gráfico de Scatchard (Fig. 9) e muito limitada ao campo do *binding*, é também muito usada para representar os resultados dos

experimentos de saturação. Historicamente, devemos esta representação ao químico George Scatchard (1949) cuja intenção original era transformar a equação bimolecular tradicional para que dados de ligação de pequenas moléculas a proteínas se tornassem lineares e pudessem ser analisados por regressão linear (Equação 3). Tal estratégia de linearização de dados havia sido feita anteriormente por Lineweaver & Burk (1934) para transformar a equação de Michaelis-Menten que descreve o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática (vide [Capítulo 7](#) para discussão sobre regressão linear e não linear).

$$[B] / [L] = (- 1 / K_d) [B] + B_{\max} / K_d \quad \text{Equação 3}$$

Onde: B = ligante ligado (*Bound*); L = ligante livre; K_d = constante de equilíbrio de dissociação e B_{\max} = ligação máxima (número de sítios de ligação).

Apesar de não se poder mais aceitar uma análise puramente gráfica para o cálculo dos parâmetros K_d e B_{\max} , o gráfico de Scatchard continua sendo bem aceito para representação dos dados experimentais devido à facilidade da sua interpretação. De fato, como exemplificado na Figura 9A, o valor de B_{\max} é obtido na abscissa, no ponto de interseção com a reta, enquanto a inclinação da reta é diretamente proporcional à afinidade (já que é igual à $-1/K_d$). Desta forma, é fácil comparar diferentes ligantes como exemplificado na Figura 9B, onde podemos concluir que o fármaco hipotético B tem uma afinidade menor do que A (inclinação menor), provavelmente para o mesmo receptor da mesma preparação (mesmo B_{\max}) enquanto o radioligante C, apesar de ter afinidade igual a A (mesma inclinação), se liga a outra população menor de receptores (B_{\max} menor).

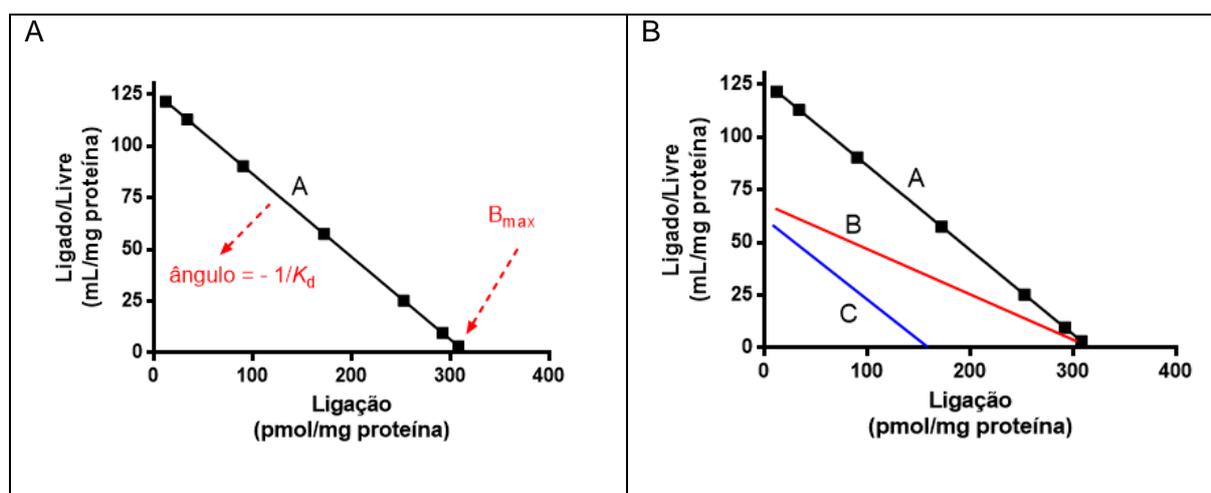


Figura 9. Gráfico de Scatchard. A: os dados teóricos da Figura 8 foram representados de acordo com a equação de Scatchard. B: Curvas teóricas correspondendo a outros dois fármacos (B e C) são representadas para ilustrar diferenças de número máximo de sítios de ligação (C) ou afinidade (B), em relação ao fármaco A. As curvas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01.

Qualquer que seja a representação gráfica escolhida (Fig. 8A, 8B ou 9A), os parâmetros K_d e B_{max} devem ser obtidos por regressão não linear dos dados não transformados para evitar viés estatístico (vide [Capítulo 7](#)).

4.3.2. Curvas de saturação atípicas (gráficos de Scatchard não lineares)

Em certos casos, as curvas de saturação podem ser mais complexas, o que é mais facilmente detectado na representação de Scatchard, pela falta de linearidade, configurando outra vantagem desta representação. De fato, diferentes situações podem levar à obtenção de gráficos de Scatchard curvilíneos, como discutido a seguir.

4.3.2.1. Gráficos de Scatchard côncavos

A principal causa deste tipo de desvio à equação bimolecular simples (vide [Figura 1](#), Equação 1A), e, portanto, à obtenção de gráficos de Scatchard lineares, é a presença de mais de um subtipo de receptor ao qual se liga o radioligante, com afinidades diferentes. Para mostrar a influência de tal fenômeno sobre as representações gráficas de ensaios de saturação, simulei a situação hipotética da presença de duas populações de receptores, sendo uma minoritária contribuindo com 16% dos sítios de ligação, e do uso de um radioligante apresentando uma afinidade 50 vezes maior para esta subpopulação de receptores. Como podemos ver na [Figura 10A](#), é praticamente impossível detectar tal desvio da situação habitual (hipérbole retangular correspondendo a uma única população de sítios, ou um radioligante não seletivo para duas populações) quando os dados são representados na forma de curva concentração-ligação. Por outro lado, o gráfico de Scatchard permite evidenciar claramente tal desvio, ainda dando pista quanto ao possível mecanismo pelo aspecto côncavo da curva ([Fig. 10B](#)).

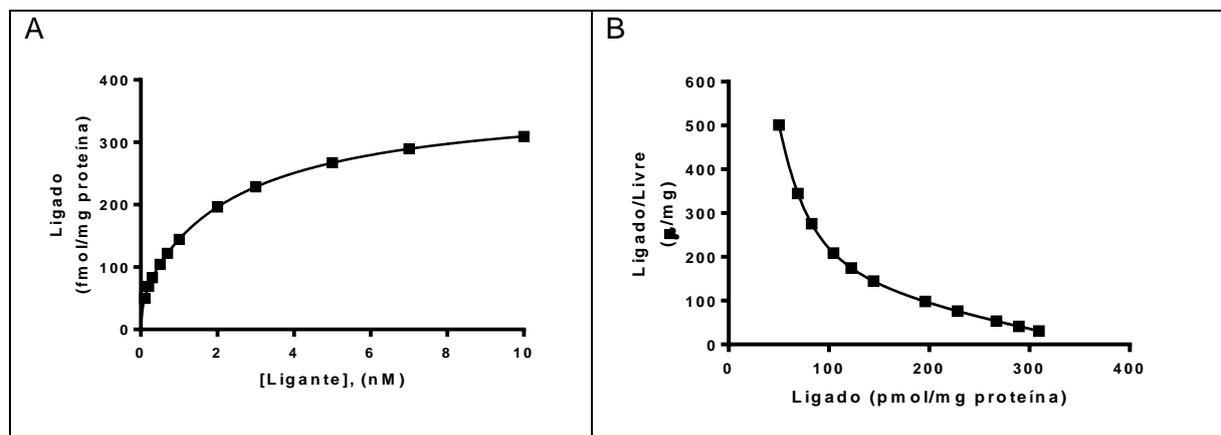


Figura 10. Análise de dados de saturação na presença de duas populações de receptores e de um radioligante seletivo. Dados teóricos foram gerados utilizando a equação correspondendo à soma da ligação aos dois receptores, e os seguintes parâmetros: sítios de alta afinidade com B_{max} de 57 fmol / mg proteína e K_d de 0,05 nM; sítios de baixa afinidade com B_{max} de 316 fmol/mg proteína e K_d de 2,5 nM. A: representação clássica (curva concentração-ligação); B: gráfico de Scatchard. As curvas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01.

A Figura 11 mostra um experimento ilustrando esta situação, quando a avaliação da ligação da [³H]-ouabaína no *Schistosoma mansoni*, permitiu evidenciar a presença de duas isoformas da Na⁺,K⁺-ATPase neste parasito (Souto Pardon e Noël, 1994).

Uma segunda possibilidade geradora de gráfico de Scatchard côncavo é a presença de interação entre diferentes sítios de ligação localizados no mesmo receptor, quando a ligação de uma molécula de radioligante em um dos sítios diminui a afinidade para ocupação do outro sítio, fenômeno chamado de cooperatividade negativa. Um exemplo clássico é o do receptor da insulina (De Meyts e cols., 1973).

Fora isso, diversos artefatos experimentais podem também levar a este tipo de gráfico, como definição incorreta da ligação não específica ou heterogeneidade do radioligante, o que pode ocorrer em função de radiólise e aparecimento de produtos de degradação. Tais possibilidades devem ser apuradas para descartar este tipo de artefato.

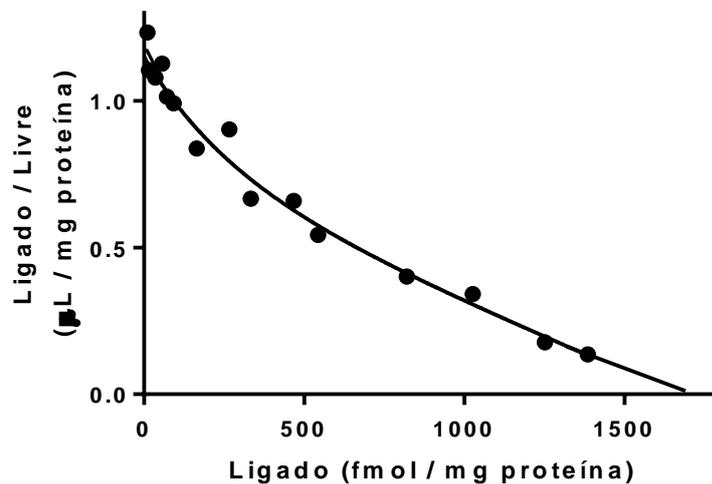


Figura 11. Gráfico de Scatchard para ligação da [³H]-ouabaína em homogenato de *Schistosoma mansoni*. Os dados de ligação específica foram analisados por regressão não linear utilizando-se o modelo de duas populações de sítios diferentes. Os parâmetros obtidos foram: sítios de alta afinidade com B_{\max} de $0,123 \pm 0,027$ pmol/mg proteína e K_d de $0,241 \pm 0,076$ μ M; e sítios de baixa afinidade com B_{\max} de $1,55 \pm 1,11$ pmol/mg proteína e K_d de $2,34 \pm 0,21$ μ M. Adaptado de Souto Pardon e Noël, 1994.

4.3.2.2. Gráficos de Scatchard convexos

Este caso, menos frequente, pode ser observado em casos de cooperatividade positiva, os quais têm sido relatados para receptores ionotrópicos, entre os quais os glutamatérgicos. Como exemplo, mostro na Figura 12B o gráfico de Scatchard obtido em ensaio de saturação com o ácido kaínico para marcar os receptores glutamatérgicos do tipo kainato em cerebelo de galinha. Pode-se observar claramente o aspecto convexo do gráfico, enquanto que a representação dos dados não transformados parece normal (Fig. 12A), mais uma vez

ilustrando uma das características da representação de Scatchard na identificação de comportamentos atípicos.

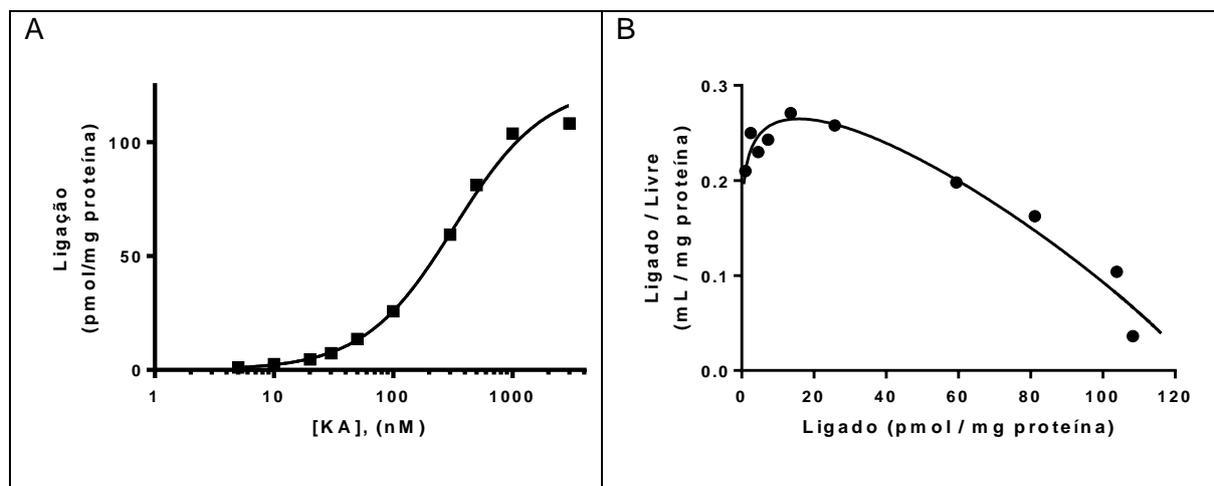


Figura 12. Gráfico de Scatchard para ligação do [³H]-kainato em preparação de cerebelo de galinha. A curva teórica foi obtida usando-se os parâmetros calculados por regressão não linear a partir dos dados não transformados utilizando o modelo de Hill (vide Capítulo 5.2.2.2.). $B_{max} = 125 \pm 7$ pmol/mg proteína; $K_d = 324 \pm 34$ nM e coeficiente de Hill (n_H) = $1,14 \pm 0,02$. Adaptado de Noël e cols., 2001.

4.4. ENSAIOS CINÉTICOS: k_{+1} e k_{-1}

4.4.1. Reações bimoleculares simples (uma população de sítios de ligação)

4.4.1.1. Cinética de associação

Para avaliar as constantes de velocidade de associação e dissociação, precisamos primeiro realizar um experimento avaliando a ligação do radioligante em função do tempo (*time-course*), como ilustrado na Figura 13A.

Estes dados são preferencialmente analisados, sem transformação, através da técnica de regressão não linear (vide Capítulo 7) utilizando o modelo de associação monoexponencial (Equação 4, GraphPad Prism 6.01) o que permite obter a constante aparente (“observada”) de velocidade de associação (k_{obs}).

$$B_t = B_{eq} \cdot (1 - e^{-(k_{obs} \cdot t)})$$

Equação 4

Onde: B_t é a quantidade de radioligante ligado especificamente no tempo t e B_{eq} é o ligante ligado no platô.

Nota-se que ainda encontramos na literatura representações lineares desta equação, onde k_{obs} é obtido pelo valor do coeficiente angular da reta, como mostrado na Figura 13B.

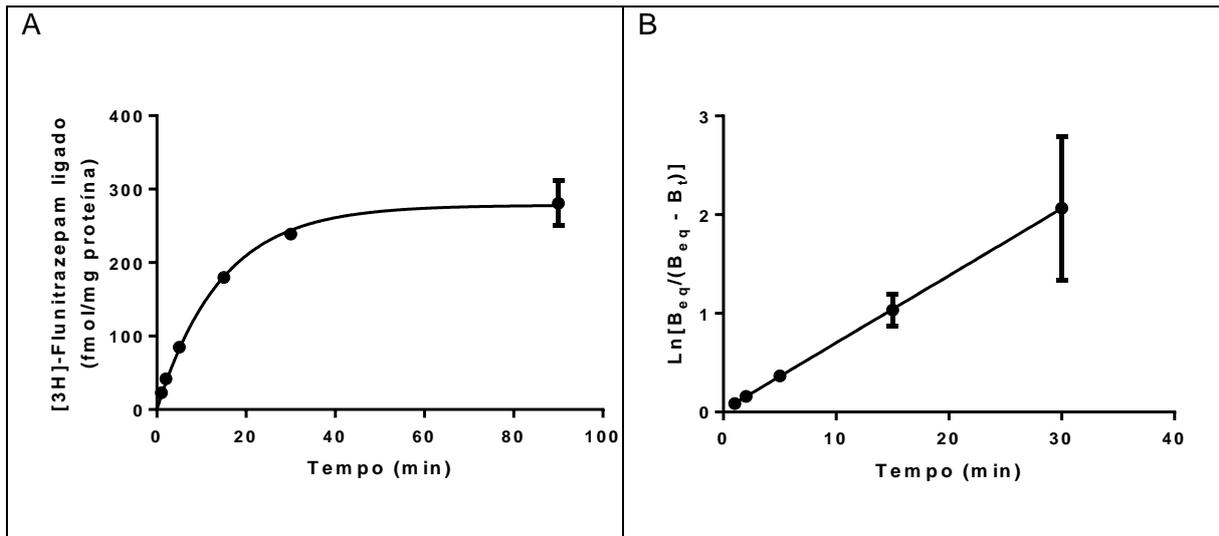


Figura 13. Cinética de ligação do [³H]-flunitrazepam (0,2 nM) a sinaptossomas de cérebros de ratos. A. curva foi ajustada através de regressão não linear utilizando o modelo de associação monoexponencial. B: análise alternativa, para linearização dos dados e uso de regressão linear, atualmente em desuso (vide [Capítulo 7](#)): gráfico de $\text{Ln}[B_{\text{eq}} / (B_{\text{eq}} - B_t)]$ em função do tempo, onde: k_{obs} é a inclinação da reta; B_t é a quantidade de radioligante ligado especificamente no tempo t , B_{eq} é o ligante ligado no platô. Adaptado de Lopes e cols., 2004.

Para se calcular a constante de velocidade de associação (k_{+1}) é preciso utilizar a equação 5 (Bennett, 1978) e o valor da constante de velocidade de dissociação, determinada em ensaio independente (vide a seguir).

$$k_{+1} = (k_{\text{obs}} - k_{-1}) / [L]$$

Equação 5

Onde: k_{+1} é a constante de velocidade de associação; k_{obs} é a constante aparente ("observada") de velocidade de associação; k_{-1} é a constante de velocidade de dissociação e $[L]$ é a concentração (livre) de ligante.

4.4.1.2. Ensaio de dissociação

Após alcançar o equilíbrio (platô), adiciona-se um pequeno volume (1%) de ligante competidor não marcado, em alta concentração, de tal forma que o radioligante se torna incapaz de se associar ao receptor. Desta forma, podemos acompanhar a dissociação do complexo radioligante-receptor em função do tempo. Os dados são analisados por regressão não linear utilizando o modelo de decaimento monoexponencial, conforme equação 6.

$$B_t = B_0 \cdot e^{(-k_{-1} \cdot t)}$$

Equação 6

Onde: B_t é a quantidade de radioligante ligado no tempo t (t_0 = tempo no qual se iniciou a dissociação); B_0 é a quantidade de radioligante ligado no equilíbrio, logo antes de iniciar o processo de dissociação (t_0); k_{-1} é a constante de velocidade de dissociação.

Notem que as curvas de decaimento se apresentam como monoexponencial (Fig. 14A) ou reta (Fig. 14B), dependendo da escala usada na ordenada (aritmética ou logarítmica, respectivamente).

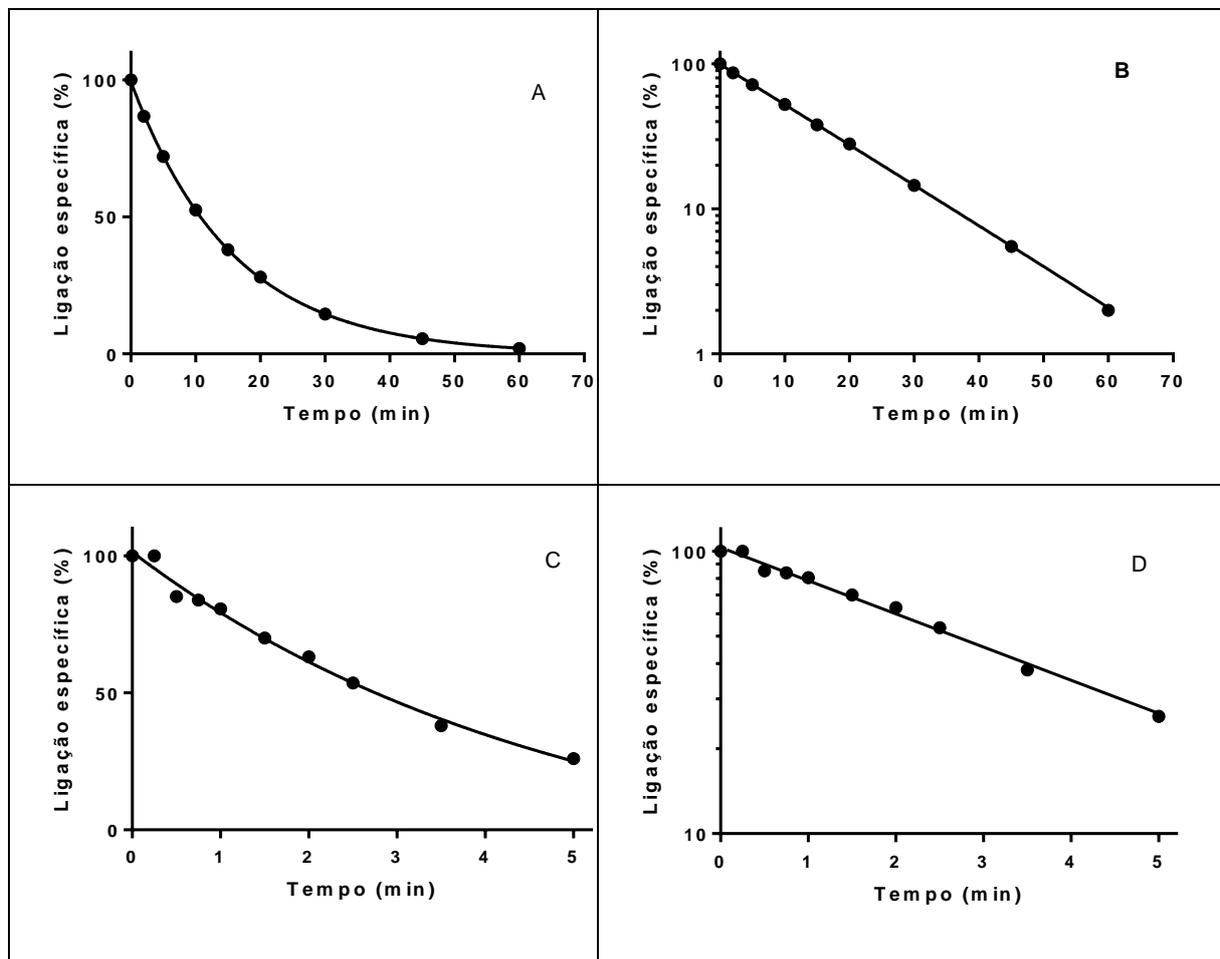


Figura 14. Cinética de dissociação. Os dados são representados por uma monoexponencial decrescente se usar escala aritmética (A), ou por uma reta se usarmos uma escala logarítmica (B). As curvas teóricas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01. C e D: Cinética de dissociação da [³H]-ouabaína do seu sítio de ligação na Na⁺,K⁺-ATPase em preparação de ducto deferente de rato, representada em escala aritmética (C) e logarítmica (D). Adaptado de Noël e cols., 1998.

4.4.2. Curvas de dissociação atípicas

4.4.2.1. Multiplicidade de sítios de ligação

Quando o radioligante se liga a duas populações de receptores, com afinidades diferentes, a curva de dissociação apresenta um aspecto curvilíneo, e não linear, quando representada em escala semi-logarítmica, como ilustrado na Figura 15 para o caso da ligação da [³H]-ouabaína à Na⁺,K⁺-ATPase de *Schistosoma mansoni*.

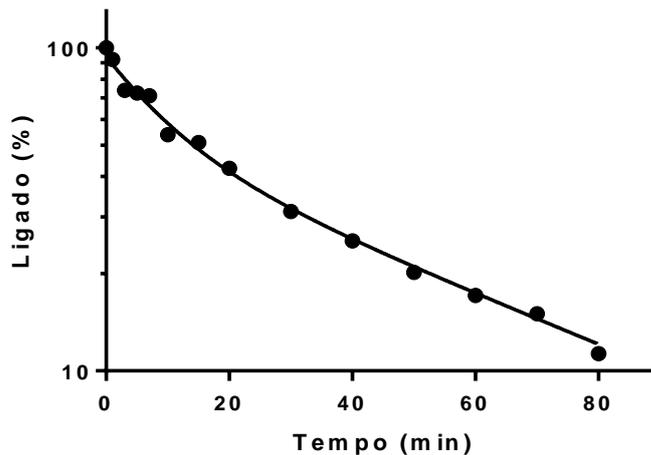


Figura 15. Cinética de dissociação da $[^3\text{H}]$ -ouabaína em homogenato de *Schistosoma mansoni*. Os dados de ligação foram analisados por regressão não linear utilizando-se o modelo de duas populações de sítios. Os parâmetros obtidos foram: $43 \pm 7\%$ de sítios de baixa afinidade (dissociação rápida: $k_{-1} = 0,10 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$) e $51 \pm 7\%$ de sítios de alta afinidade (dissociação lenta: $k_{-1} = 0,018 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$). Nota-se que estas porcentagens não correspondem às densidades dos receptores na preparação, mas às proporções dos dois sítios marcadas pela $[^3\text{H}]$ -ouabaína 70 nM, uma concentração baixa que privilegia a ligação aos sítios de maior afinidade (vide Figura 11). Adaptado de Souto Pardon e Noël, 1994.

4.4.2.2. Cooperatividade

Existe pelo menos uma outra situação na qual podemos obter curvas de dissociação curvilíneas (em escala logarítmica): a existência de cooperatividade entre sítios de ligação pertencendo à mesma proteína. Este fenômeno ocorre quando a afinidade do ligante para um sítio é aparentemente aumentada (cooperatividade positiva) ou diminuída (cooperatividade negativa) pela ligação de uma molécula deste ligante a outro sítio da proteína.

Este fenômeno deve ser suspeitado caso o ensaio de dissociação seja realizado por competição (conforme sugerido no Capítulo 6.2. _). Uma forma simples de avaliar o mecanismo responsável pela aparência curvilínea da curva de dissociação é comparar a dissociação obtida por competição e por diluição (diluição de pelo menos 50 vezes com meio desprovido de radioligante). Caso a dissociação seja mais rápida quando estimulada pela adição de alta concentração de ligante (competição) do que por simples diluição, deve-se pensar na presença de cooperatividade negativa: a ocupação de um sítio por um ligante não marcado diminui a afinidade do radioligante para o outro sítio, o que geralmente se traduz pelo aumento da sua velocidade de dissociação. Um exemplo clássico é o do receptor da insulina (De Meyts e cols., 1973), que também gerou gráfico de Scatchard atípico (vide Capítulo 4.3.2.).

Por outro lado, uma dissociação mais lenta quando é desencadeada por competição do que por simples diluição, sugere uma cooperatividade positiva: a ocupação de um sítio de

ligação por um ligante não marcado aumenta a afinidade do radioligante pelo outro sítio, o que se traduz por uma maior estabilidade do complexo radioligante-receptor. O exemplo clássico é da ligação do oxigênio na hemoglobina (Koshland e cols., 1966).

4.5. APLICAÇÕES

4.5.1. Desenvolvimento de fármacos: avaliação do mecanismo de ação molecular de novos candidatos a fármaco

Em projeto de desenvolvimento de fármacos, uma vez eleito o candidato a fármaco (*lead compound*), é comum fazer a radiomarcagem do mesmo para poder avaliar diretamente sua afinidade (através do K_d) assim como suas constantes de velocidade de associação (k_{+1}) e dissociação (k_{-1}). Desta forma, podemos obter duas informações importantes:

- Determinar se o valor da constante de dissociação obtido no experimento de saturação é igual ao valor da razão entre as constantes de velocidade já que, por definição, $K_d = k_{-1} / k_{+1}$ (vide **Figura 1**). Desta forma, verifica-se a coerência dos valores obtidos podendo afastar a presença de fatores complicadores ou de artefato.

- Determinar o tempo de residência do fármaco no receptor, aspecto cada vez mais relevante em projetos de desenvolvimento de fármacos, como discutido no Capítulo **5.3**.

4.5.2. Avaliação de alterações de afinidade e/ou número de receptores: estudo em doenças, ontogenia e envelhecimento ou distribuição no organismo.

- Doença: Muitas informações sobre doenças foram obtidas por estudos de *binding* realizados *post-mortem*. Como exemplo, foi mostrado que a densidade de ambos os receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 estava elevada no estriado de doentes com Parkinson quando virgens de tratamento farmacológico. Ao contrário, na esquizofrenia, somente a densidade dos receptores D_2 estava aumentada (Pearce e cols., 1990).

O mesmo tipo de estudo é utilizado para evidenciar alteração de afinidade e/ou número de receptores em modelos experimentais visando estudar a plasticidade dos receptores após situações como desnervação, como ilustrado na Figura 16, onde mostramos que o número de sítios de ligação de alta afinidade para ouabaína diminuía drasticamente no ducto deferente de rato, 14 dias após sua desnervação (Quintas e cols., 2000).

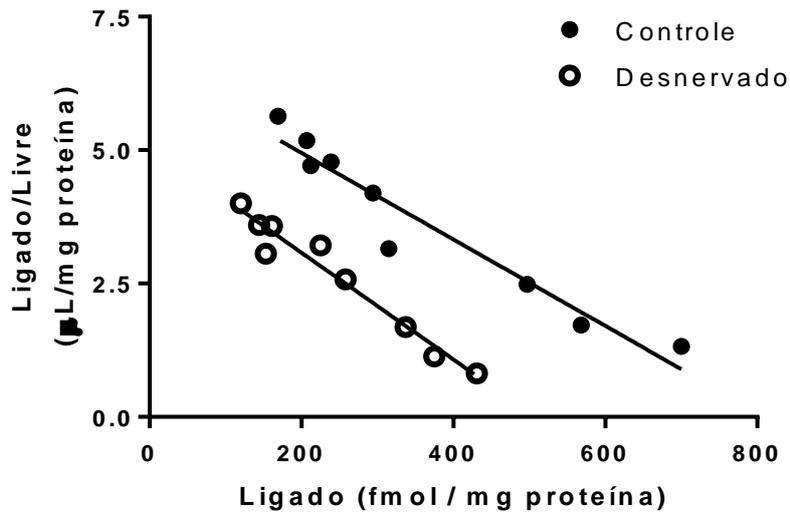


Figura 16. Gráfico de Scatchard para ligação específica de $[^3\text{H}]$ -ouabaína em preparação bruta de ducto deferente de ratos Wistar adultos: grupo controle e tratado (14 dias após desnervação cirúrgica). Adaptado de Quintas e cols., 2000. Para interpretação de gráficos de Scatchard, consulte a [Figura 9](#).

- Ontogenia e envelhecimento:

Os mesmos ensaios de saturação podem ser usados para avaliar possíveis alterações de receptores (em número ou sensibilidade ao fármaco) durante o desenvolvimento e envelhecimento. Para ilustrar esta aplicação, a Figura 17 mostra que o número de sítios de ligação da $[^3\text{H}]$ -ouabaína é 3-4 vezes menor no coração de ratos adultos quando comparado com ratos neonatos, sem que haja mudança de afinidade (Lopez e cols., 2002).

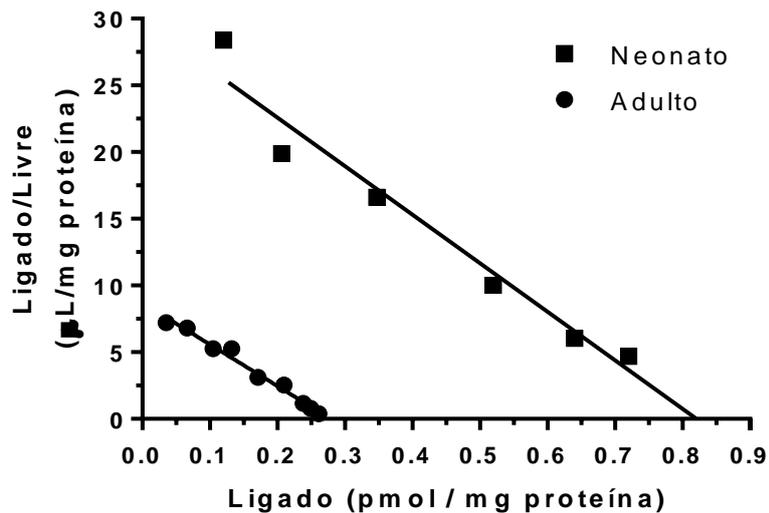


Figura 17. Gráfico de Scatchard para ligação específica de $[^3\text{H}]$ -ouabaína a preparações brutas de coração de rato recém-nascido (neonato, 24 h) e adulto (3 meses). Cada ponto é a média das determinações em triplicata num experimento típico. Adaptado de Lopez e cols., 2002. Para interpretação de gráficos de Scatchard, consulte a [Figura 9](#).

- Distribuição de receptores no organismo:

Estudos de saturação podem ser usados para determinar a densidade de um determinado receptor em diferentes estruturas de um organismo. Este tipo de levantamento é muito útil para nortear a escolha do tecido (vide Capítulo 4.2.2.) a ser usado como fonte de receptor para estudos de *binding*, quer seja em *screening* de novas substâncias (vide Capítulo 5.2.) ou para estudar mais detalhadamente as características de ligação de um radioligante a um receptor. Um bom exemplo disso é o trabalho que permitiu concluir que o hipocampo era mais adequado do que outras estruturas do cérebro de rato como córtex, estriado e tronco cerebral para o estudo dos receptores 5-HT_{1A} com o radioligante [³H]-8-OH-DPAT (Hall e cols., 1985).

Capítulo 5. ENSAIO DE LIGAÇÃO INDIRETO (com substâncias-testes não marcadas)

“Sonhe grandes coisas, isto te permitirá pelo menos realizar umas muito pequenas”

Jules Renard

5.1. INTRODUÇÃO

Como discutido no **Capítulo 2**, a determinação da afinidade de substâncias testes é parte importante do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, quer seja na fase de *screening* farmacológico ou de detalhamento do mecanismo de ação. Enquanto um ensaio de *binding* direto é possível para um candidato a fármaco para o qual se decidiu investir no processo de radiomarcagem (vide **Capítulo 4**), na fase de *screening* e de otimização de compostos-protótipos, temos que recorrer a ensaios indiretos, de competição, já que as substâncias-testes não são disponíveis na forma de radioligantes.

5.2. ENSAIOS DE COMPETIÇÃO NO EQUILÍBRIO: DETERMINAÇÃO DE K_i

5.2.1. Fundamentos teóricos

Baseado na Lei de Ação das Massas e na saturabilidade dos sítios de ligação específicos (número finito de receptores), podemos facilmente entender a competição que pode ocorrer entre dois ligantes para ocupar os mesmos sítios (*desde que os dois se liguem de forma reversível*). Desta forma, desenvolveu-se o ensaio de *binding* de competição entre um radioligante seletivo para um receptor, em geral disponível comercialmente, e uma substância-teste não marcada. A equação 7 determina o nível de ligação do radioligante na presença de um ligante competidor reversível, dentro do contexto de reações bimoleculares simples, como ilustrado na Figura 18.

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1+10^{(X-\text{Log } CI_{50})}) \quad \text{Equação 7}$$

Onde: Y é a ligação específica do radioligante na presença de competidor (geralmente expressa em % da ligação na ausência de competidor); X = logaritmo da concentração do competidor; Bottom = valor mínimo e Top = valor máximo de Y. CI_{50} = concentração do competidor necessária para diminuir metade da ligação do radioligante. Nota-se que esta equação pode ser escrita de diferentes formas. Mostramos aqui a equação da forma que é usada no programa GraphPad Prism 6.01, onde há necessidade de inserir os valores das concentrações do competidor em logaritmo e onde os valores máximos (*Top*) e mínimos (*Bottom*) de ligação específica do radioligante não são fixos (*i.e.*, não necessariamente fixos em 100% e 0%, respectivamente).

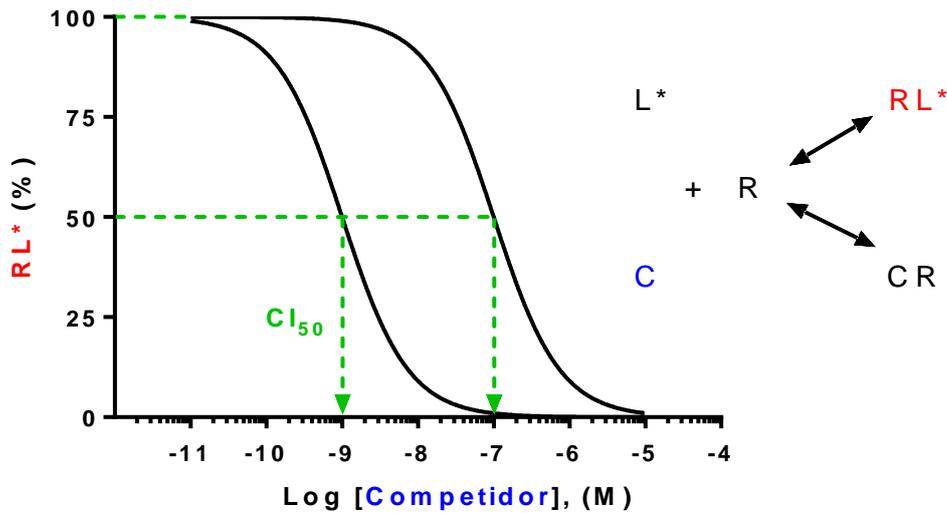


Figura 18. Esquema ilustrando o princípio do ensaio de competição para determinação da afinidade de uma substância-teste, não marcada. O valor da ligação específica do radioligante medida na ausência de competidor (controle) é considerado como 100%. Nesta simulação, a substância B necessita de concentrações maiores do que a substância A para diminuir a ligação do radioligante, o que pode ser quantificado pelo valor de CI_{50} 100 vezes maior, indicando uma afinidade 100 vezes menor.

Uma vez determinado o valor de CI_{50} , através de análise da curva de competição por regressão não linear (vide [Capítulo 7](#)) usando-se a equação 7, podemos calcular a constante de equilíbrio de dissociação do competidor ao aplicar a equação de Cheng-Prusoff (eq.8). Nota-se que esta constante é chamada de K_i , em vez de K_d , simplesmente para informar que foi obtida em ensaio de “inibição” (competição) e não em ensaio direto de ligação (vide [Capítulo 4](#)).

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

Equação 8

Onde: $[L^*]$ é a concentração de radioligante e K_d sua constante de equilíbrio de dissociação, obtida em experimento de saturação (vide [Capítulo 4.3.1](#)).

É importante frisar a diferença existente entre CI_{50} e K_i : o CI_{50} é um parâmetro que varia em função da afinidade do radioligante usado (K_d) e da sua concentração (L^*) enquanto que o K_i é uma constante que não depende destas condições. Esta diferença é ilustrada na Figura 19, onde podemos ver que à medida que se aumenta a concentração do radioligante, este ocupa uma proporção cada vez maior dos sítios de ligação (vide valor de Y quando X = 0). Ao mesmo tempo, a curva de competição é deslocada para direita, acarretando um aumento no valor do CI_{50} , como previsto pela equação de Cheng-Prusoff.

Na prática, a diferença entre os valores de CI_{50} e K_i é geralmente pequena, já que a maioria dos autores usa uma concentração de radioligante igual ou abaixo do seu valor de K_d , levando a uma correção dos valores de CI_{50} por um fator inferior a duas vezes.

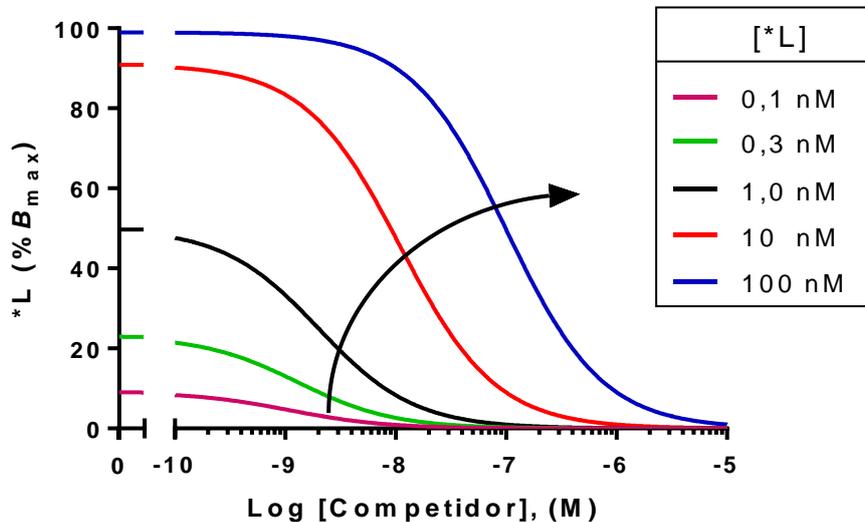


Figura 19. Curvas de competição: efeito da concentração do radioligante sobre o valor de CI_{50} do competidor. As curvas foram simuladas considerando valores idênticos (1 nM) para o K_d do radioligante e o K_i do competidor. Os valores de CI_{50} passam de 1,1 nM para 99 nM, quando a concentração do radioligante passa de 0,1 a 100 nM. As simulações foram realizadas com o programa GraphPad Prism 6.01.

5.2.2. Aspectos práticos

5.2.2.1. Tempo para alcançar o equilíbrio na presença de competidor

Nos experimentos de competição, há dois ligantes competindo para ocupação do mesmo receptor, o que aumenta o tempo necessário para alcançar o equilíbrio. Desta forma, experimentos cinéticos devem ser feitos para garantir que o tempo escolhido para realização dos experimentos de competição seja suficiente para que os dois ligantes alcancem o equilíbrio (vide Capítulo 5.3.2. , ensaio de *association competition assay*) (Kenakin, 2009).

5.2.2.2. Curvas atípicas e coeficiente de Hill

Em certos casos, as curvas de competição podem ter uma inclinação diferente do esperado, o que é percebido pelo fato do efeito do fármaco ocorrer numa faixa de concentração menor ou maior do que o normal, prevista pela equação simples de Langmuir-Hill (vide Capítulo 4). Nos casos “normais” de reações bimoleculares no equilíbrio, a razão entre as concentrações necessárias para produzir 10 e 90 % do E_{max} esta próxima de 100 (2 unidades logarítmicas).

Nos casos em que a inclinação parece atípica, é recomendado usar uma equação mais geral, na qual é incluído um parâmetro adicional (n_H = coeficiente de Hill) cujo valor determina a inclinação da curva: se menor do que 1, a curva é menos inclinada; se maior do que 1, a curva é mais inclinada, conforme ilustrado na Figura 20.

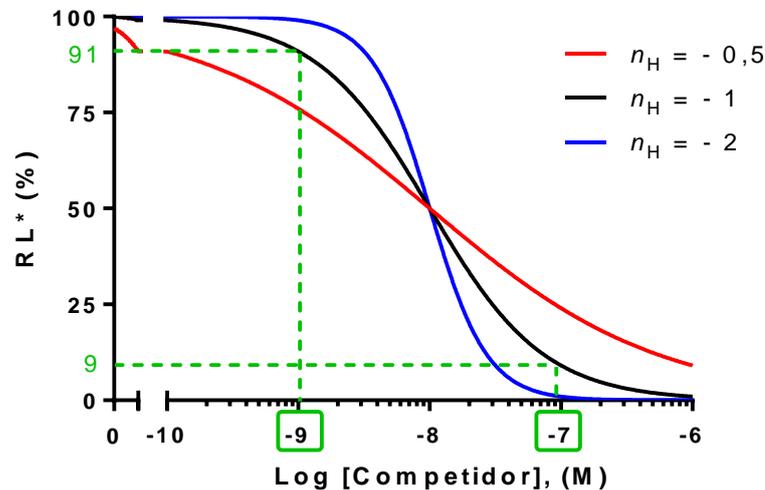


Figura 20. Curvas de competição com diferentes inclinações. As curvas teóricas foram simuladas considerando-se o mesmo valor de CI_{50} (10 nM) e diferentes valores do coeficiente de Hill. Quando $n_H = -1$, a faixa de concentrações onde ocorre o "efeito" (9-90%) corresponde aproximadamente a duas unidades logarítmicas, como indicado na Figura. As simulações foram realizadas com o programa GraphPad Prism 6.01.

$n_H < 1$

Diferentes situações podem ser responsáveis por valores de n_H menores do que 1 sendo a mais comum a existência de múltiplos receptores, ou sítios de ligação, para os quais o competidor tem afinidades diferentes (Fig. 21). Neste caso, recomenda-se utilizar um radioligante não seletivo para facilitar a análise da curva de competição e a determinação dos valores de K_i do competidor para os dois sítios.

Uma segunda possibilidade é a existência de cooperatividade negativa entre sítios existentes no mesmo receptor (vide Capítulo 4.3.2.).

$n_H > 1$

Por outro lado, valores de n_H maiores do que 1 podem indicar a existência de cooperatividade positiva (vide Capítulo 4.3.2.), ligação irreversível ou até de um fenômeno inespecífico.

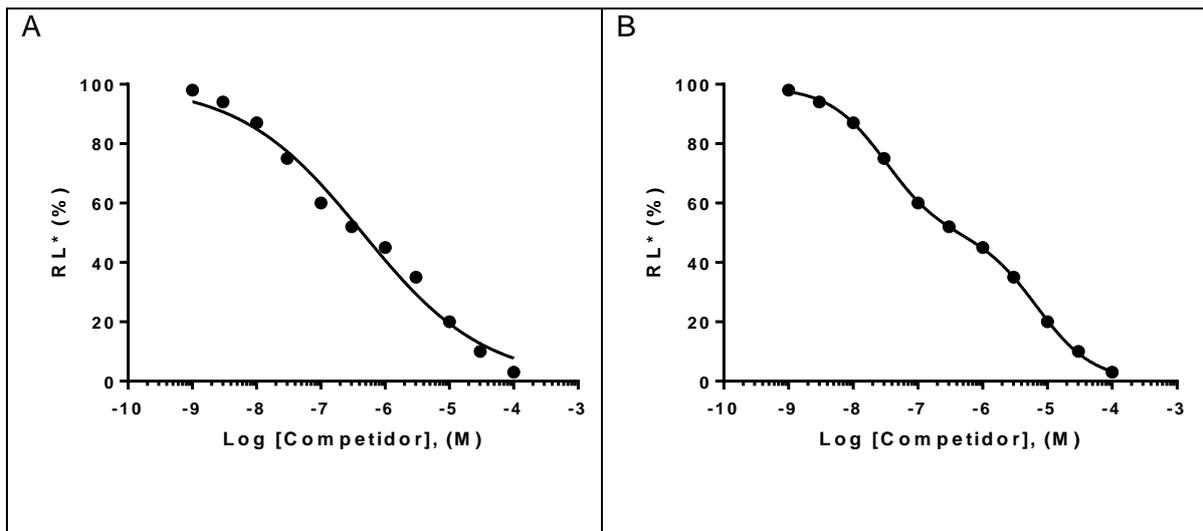


Figura 21. Análise de curva de competição atípica. A. Os dados, teóricos, foram analisados por regressão não linear com o modelo de Hill (equação 7, com adição de coeficiente de Hill – vide Dica 4), obtendo-se os seguintes parâmetros: $CI_{50} = 0,44 \mu\text{M}$ e $n_H = -0,45$. Apesar do ajuste (*fitting*) ser muito bom ($R^2 = 0,986$), um valor tão baixo de coeficiente de Hill deveria levantar a hipótese de presença de dois sítios de ligação. B: Os mesmos dados foram analisados usando-se o modelo de dois sítios de ligação (radioligante não seletivo), obtendo-se os seguintes parâmetros: 50% de sítios de alta afinidade ($CI_{50} = 30 \text{ nM}$) e 50% de sítios de baixa afinidade ($CI_{50} = 7 \mu\text{M}$). Como podemos observar, o ajuste foi melhor, o que pode ser aferido não somente pela análise visual como também pelo menor valor de R^2 (0,9998) e, sobretudo, por comparação dos dois modelos pelo teste F (vide [Capítulo 7](#)), disponível no programa GraphPad Prism 6.01 utilizado para esta análise.



Dica 4. Coeficiente de Hill. Este parâmetro, n_H , foi introduzido em 1910 por Archibald Hill quando derivou a equação conhecida como equação de Hill (equação logística de 3 parâmetros – vide eq.9), originalmente para descrever a curva sigmoidal de ligação de O_2 à hemoglobina. Com esta equação, Hill se propôs a descrever de forma mais geral a relação entre a concentração de um fármaco e seu efeito, estando bem ciente da ausência de base física deste parâmetro n_H , unicamente descritivo. Esta foi mais uma contribuição para Farmacologia quantitativa deste estudante de matemática que passou a se interessar pelas ciências naturais quando iniciou seus trabalhos de fisiologia sob a supervisão de William Langley, o primeiro a propor a existência de receptores (vide [Capítulo 1](#)).

$$[RL] = \frac{[RL]_{\max} \cdot [L]^n}{(K_{0,5})^n + [L]^n} \quad \text{Equação 9}$$

Onde: $[L]$ é a concentração de ligante; $[RL]_{\max}$ é o número total de sítios de ligação (ligação máxima); n é o coeficiente de Hill (n_H) e $K_{0,5}$ = concentração de ligante necessária para ocupar 50% dos sítios de ligação (= K_d quando $n_H = 1$).

5.2.3. Aplicações

5.2.3.1. Descoberta e desenvolvimento de fármacos

5.2.3.1.1. Screening

Como já discutido no **Capítulo 2**, os ensaios de *binding* são muito usados no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. No caso dos ensaios indiretos, de competição, eles são usados de rotina para o *screening* farmacológico visando à seleção de *hits* para o receptor-alvo. Algumas firmas especializadas oferecem este tipo de serviço em grande escala tanto para a Indústria Farmacêutica como para pesquisadores de Universidades, como a empresa Eurofins (<http://www.eurofins.com/biopharma-services/discovery/services/in-vitro-pharmacology/gpcrs/binding/>). Por outro lado, estes ensaios podem ser realizados de forma mais artesanal, com baixo rendimento, mas eventualmente menos vieses do que em programas de HTS, em nossos laboratórios de pesquisa nas Universidades (Noël e cols., 2001). Para tanto, a etapa de validação do ensaio com fármacos de referência é indispensável e deve ser realizada com os devidos cuidados (Fig. 22).

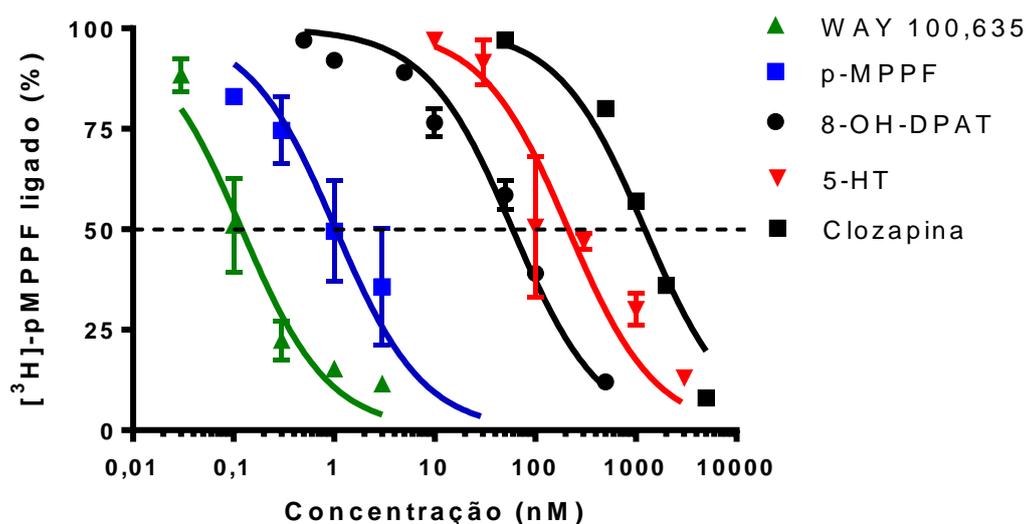


Figura 22. Curvas de competição com diferentes ligantes, para validação do ensaio de *binding* ao receptor 5-HT_{1A}, utilizando o antagonista [³H]-pMPPF como radioligante. *Retirado de:* Portfolio de ensaios do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, ICB-UFRJ (disponível em: <http://francoisnoelfarmac.wixsite.com/fnoel/laboratorio>).

5.2.3.1.2. Relação Estrutura-Atividade (REA)

Uma vez que alguns ligantes foram identificados para um receptor-alvo, os ensaios de competição servem também para viabilizar estudos de REA, ao comparar as afinidades de várias substâncias de uma mesma série química. Desta forma, os ensaios de *binding* de competição são essenciais para que a Farmacologia possa realimentar a Química

Medicinal/Farmacêutica com dados que permitem planejar novas substâncias de forma racional, em projetos direcionados para um alvo (*Target-Based Drug Discovery*).

5.2.3.1.3. Validação de modelos de *docking* para triagem virtual

Técnicas de modelagem molecular *in silico* são cada vez mais empregadas no processo de descoberta de novos fármacos quer seja para selecionar (“filtrar”) substâncias dentro de uma quimioteca, quer seja para direcionar o planejamento e síntese de novas moléculas (Braga e cols., 2014). Entre estas técnicas, o *docking* (ancoramento molecular) é um método que permite prever a orientação preferencial que uma pequena molécula teria em relação ao sítio de ligação do receptor. Uma vez estabelecida a melhor disposição espacial (*pose*) de ambos, é possível estimar a afinidade relativa de diferentes substâncias para o receptor, utilizando funções de pontuação (*scoring*), por exemplo. Caso sejam validados, tais métodos podem ser usados para uma triagem virtual visando identificar dentro de um banco de moléculas um conjunto de substâncias que possam ter afinidade para um determinado alvo, dentro de uma estratégia baseada na estrutura do alvo molecular (Braga e cols., 2014). Esta validação é realizada por comparação entre a pontuação obtida *in silico* e os valores de afinidade determinados em ensaios de *binding* (competição) com um conjunto de substâncias de referência usadas para este fim. Esta validação é indispensável já que as técnicas atuais de modelagem molecular carecem de boas ferramentas para obter boas estimativas das mudanças de entropia relacionadas à formação do complexo ligante-receptor, ao contrário das previsões das mudanças de entalpia que ocorrem com a formação do complexo (vide discussão no Capítulo 6.3.).

5.2.3.1.4. Avaliação de seletividade

Em projetos de descoberta de fármacos, os ensaios de *binding* de competição são usados muito precocemente para fazer uma avaliação da seletividade dos ligantes apresentando afinidade para o receptor alvo (*hits*). De fato, sabemos que “nenhum fármaco causa efeito único, específico: os fármacos são apenas seletivos em suas ações” (Von Zastrow, 2012). Geralmente, a avaliação de seletividade é feita baseando-se na afinidade relativa para o receptor-alvo e para o receptor não-alvo (*off-target*), utilizando-se a seguinte fórmula: $K_i \text{ não-alvo} / K_i \text{ alvo}$ (Bowes e cols., 2012) onde K_i é a constante de equilíbrio de dissociação do fármaco para o receptor. Quanto ao nível de seletividade que podemos considerar como bom/desejado, os critérios a serem adotados dependerão da natureza do não-alvo e, portanto do risco atrelado à sua inibição (ou ativação). Um fator de pelo menos 100 vezes ($K_i \text{ não-alvo} / K_i \text{ alvo}$) pode ser considerado suficiente para a inibição de hERG, um dos não-alvos mais perigosos já que a inibição deste canal de K^+ é responsável por arritmias cardíacas.



Dica 5. Promiscuidade farmacológica vs. fármacos multialvos. A "promiscuidade farmacológica" pode ser definida como a propriedade de uma substância possuir atividade farmacológica em múltiplos alvos. Neste contexto, classicamente, entende-se como alvos tanto os alvos terapêuticos como os não-alvos. Desta forma, fármacos promíscuos, às vezes chamados de "sujos", não são desejados e a promiscuidade farmacológica é vista como potencial fonte de efeitos adversos e comprometedora da segurança, não sendo desejada em projetos de desenvolvimento de novos fármacos (pelo menos aqueles "clássicos" focados no paradigma de "one drug-one target", cunhado por Paul Ehrlich). Por outro lado, fármacos multialvos atuam "seletivamente" em poucos alvos moleculares de interesse para o controle de doenças multifatoriais, como transtornos psiquiátricos, câncer, AIDS e doenças cardiovasculares (Roth e cols., 2004; Lu e cols., 2012).

5.2.3.2. Mecanismo molecular de ação: reversibilidade da ligação

Os estudos de *binding* podem ser usados para determinar se a ligação de uma substância em estudo é reversível ou irreversível, o que é importante para prever ou interpretar efeitos desta substância. Para ilustrar esta aplicação, apresento dois tipos de ensaio de *binding* que utilizamos para avaliar a ligação de um cumestano sintético (PCALC36) à Na^+, K^+ -ATPase de rato (Pôças e cols., 2003). No primeiro ensaio (Fig. 23), estudamos o efeito do PCALC36 sobre curvas de concentração-ligação da $[\text{}^3\text{H}]$ -ouabaína, clássico ligante e inibidor deste receptor (bomba de Na^+). O gráfico de Scatchard indica claramente que o PCALC36 não alterou a afinidade aparente da $[\text{}^3\text{H}]$ -ouabaína (inclinações semelhantes das curvas), mas diminuiu o seu número máximo de sítios de ligação de forma concentração-dependente (diminuição do valor medido na interseção das curvas com a abscissa). De forma clássica, este resultado pode ser interpretado como sendo a indicação de ligação irreversível do competidor ao receptor (correspondendo a um antagonismo competitivo irreversível).

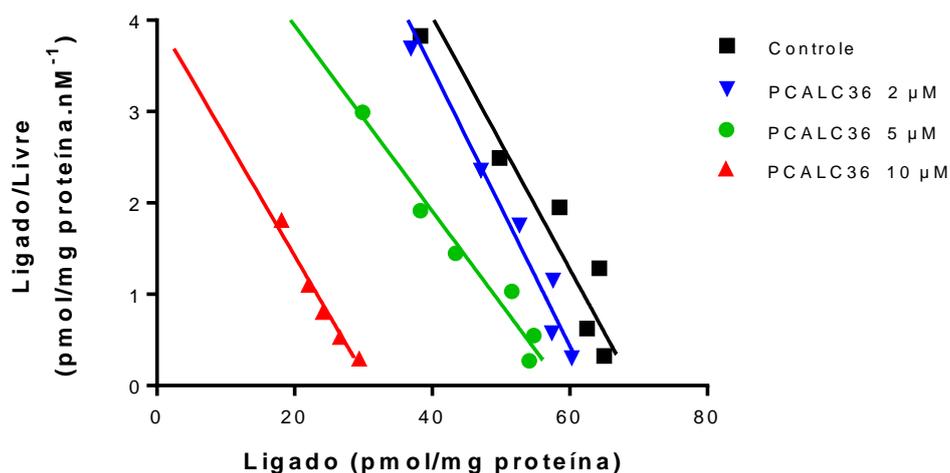


Figura 23. Gráfico de Scatchard para a ligação de $[\text{}^3\text{H}]$ -ouabaína em preparação de cérebro de rato na ausência (controle) e presença de concentrações crescentes de PCALC36, um cumestano sintético. As curvas foram obtidas por regressão não linear dos dados não transformados (*i.e.*, ligação específica vs. concentração) usando-se o modelo de uma única classe de sítios de ligação. Adaptado de Pôças e cols., 2003.

Para confirmar esta hipótese, podemos utilizar outro protocolo visando avaliar diretamente a estabilidade do complexo formado entre a substância competidora (PCALC36) e o receptor. A Figura 24 mostra o resultado do experimento de reversibilidade, onde podemos ver que a lavagem (por diluição e centrifugação) da preparação pré-incubada com o competidor não foi capaz de provocar a dissociação do complexo PCALC36-receptor, já que não houve reversão do efeito sobre a ligação máxima da $[^3\text{H}]$ -ouabaína. Desta forma, este tipo de ensaio permitiu fechar o diagnóstico de irreversibilidade da ligação da nossa substância-teste, sugerido pelos dados da Figura 23.

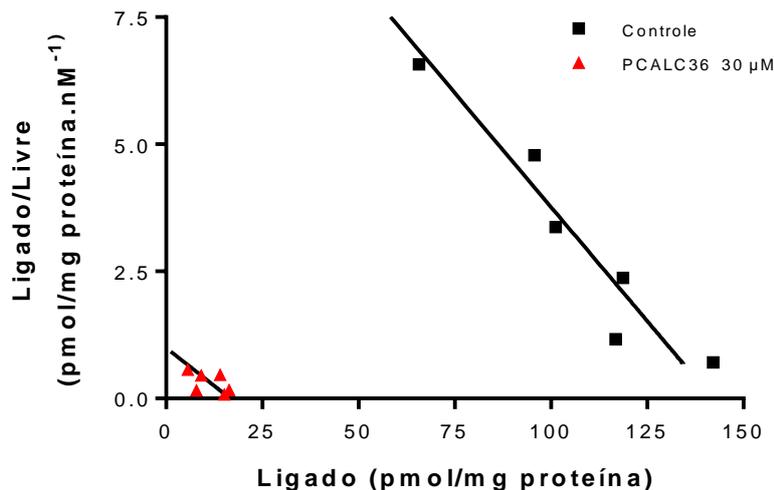


Figura 24. Estudo da reversibilidade do efeito de PCALC36 sobre a ligação de $[^3\text{H}]$ -ouabaína em preparação de cérebro de rato. A preparação foi pré-tratada com PCALC36 30 μM ou água (controle) durante 2 horas antes de ser lavada por diluição e centrifugação. O *pellet* foi então ressuspenso e usado em ensaio de *binding* na ausência de PCALC36. As curvas foram obtidas por regressão não linear dos dados não transformados usando-se o modelo de uma única classe de sítios de ligação. Adaptado de Pôças e cols., 2003.

5.3. ENSAIOS DE CINÉTICA: DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA

5.3.1. Fundamentos teóricos

Em certos casos, parece que o fator determinante da atividade farmacológica *in vivo*, e da sua duração, não seria a afinidade do fármaco para seu receptor, mas o tempo de vida do complexo fármaco-receptor (Copeland, 2016; Guo e cols., 2012). *Stricto sensu*, conforme definido originalmente (Copeland e cols., 2006), o tempo de residência do fármaco no alvo (τ) é o recíproco da constante de velocidade de dissociação (k_{off} , k_{-1}), ou seja: $\tau = 1/k_{\text{off}}$. De acordo com este modelo, a atividade farmacológica (pelo menos para antagonistas e inibidores enzimáticos) dependeria da ligação do fármaco ao seu alvo desejado, sendo que a atividade farmacológica persistiria somente enquanto o fármaco permanecer ligado. Desta forma, pode haver interesse em fármacos com longo tempo de residência, sobretudo se este

for maior do que o tempo de meia-vida plasmática (Copeland, 2016), sendo assim um fator importante para entender a relação Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD).

Um breve resumo sobre o tema encontra-se na matéria publicada na *Newsletter* da SBFTE, disponível em: <http://www.sbfte.org.br/wp-content/uploads/2017/05/7.Tempo-de-residencia-abril2016.pdf>

5.3.2. Aspectos práticos

Diferentes protocolos experimentais foram propostos para avaliar o tempo de residência de um ligante não radioativo ao seu receptor. Entre estes, o método de competição de associação (*competition association assay*) proposto por Motulsky e Mahan (1983) permite o cálculo tanto da constante de velocidade de associação (k_{+1}) como de dissociação (k_{-1}). Entretanto, este método é laborioso porque exige a realização de ensaios de cinética de associação tanto do radioligante sozinho como na presença de três concentrações diferentes do ligante competidor, em diferentes tempos até chegar ao equilíbrio (Fig. 25). Ademais, deve-se realizar experimentos de *binding* no equilíbrio e de cinética com o radioligante, para obter os valores de K_d , k_{+1} e k_{-1} do radioligante. De fato, estes valores devem ser introduzidos na equação a ser usada para ajuste das curvas experimentais por regressão não linear a fim de se estimar os valores de k_{+1} e k_{-1} do competidor a ser testado. Nota-se que esta equação está disponível no programa GraphPad Prism 6.01, sob a denominação “*kinetics of competitive binding*”.

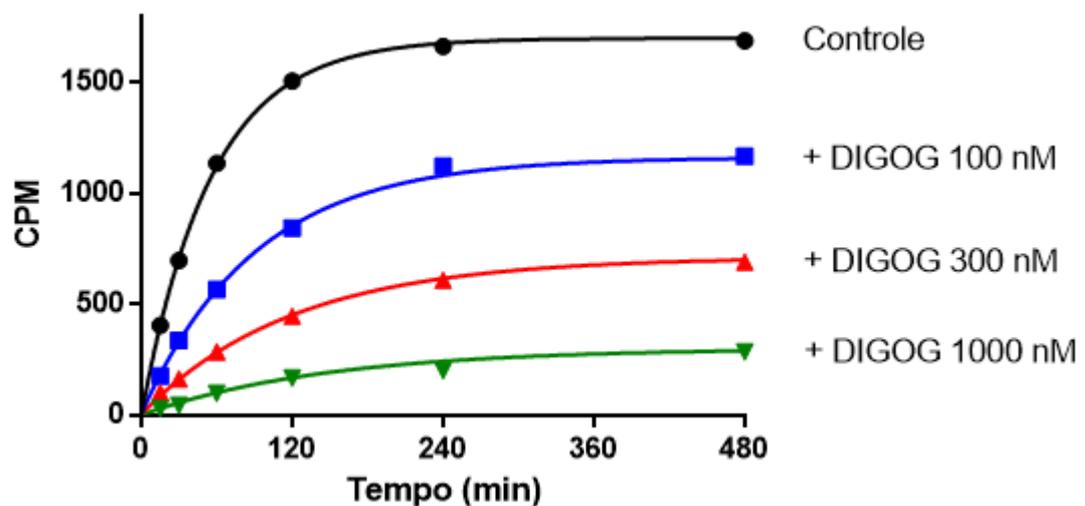


Figura 25. Ensaio de competição de associação para determinar as constantes de velocidade da digoxigenina para sua ligação à Na^+, K^+ -ATPase de rim de porco. A ligação da ^3H -ouabaína (0,2 nM) foi realizada em preparação de rim de porco na ausência (controle) e presença de três concentrações de digoxigenina (DIGOG) não marcada. O conjunto de dados foi analisado por regressão não linear usando-se a equação proposta por Motulsky & Mahan (1983), com o programa GraphPad Prism 6.01, gerando as curvas que correspondem aos parâmetros encontrados. Dados não publicados.

Alternativamente, protocolos mais simples foram propostos para comparar substâncias entre si no que diz respeito às suas cinéticas, mas sem fornecer valores para suas constantes de velocidade. Entre estes, destacamos o protocolo de “*dual point*” proposto por Guo e cols. (2013) para triagem cinética rápida e de alta vazão de substâncias, durante o processo de *screening* farmacológico (Fig. 26).

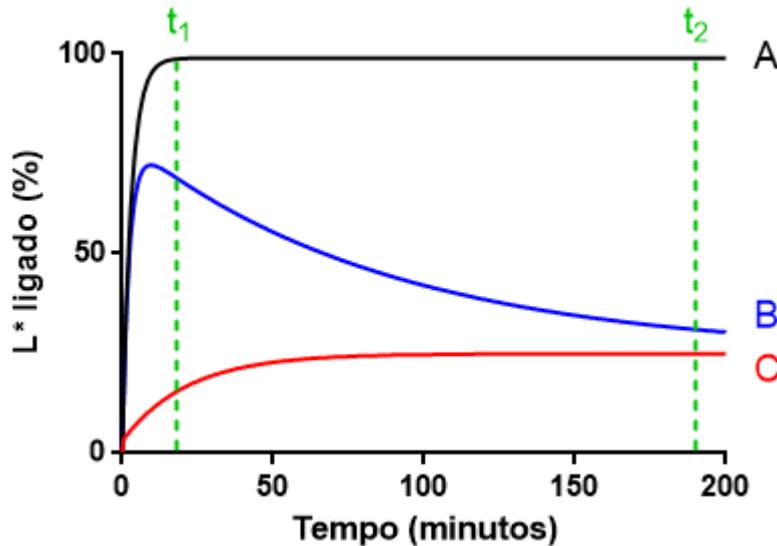


Figura 26. Representação esquemática do ensaio de competição de associação *dual-point*. A: curva de associação do radioligante sozinho (controle). B: curva de associação do radioligante incubado com um competidor não radioativo que se dissocia mais lentamente do que o radioligante. C: curva de associação do radioligante incubado com um competidor não radioativo que se dissocia mais rapidamente do que o radioligante. As simulações foram geradas considerando que os ligantes B e C são usados na mesma concentração, correspondendo ao valor de K_i idêntico dos dois ligantes, diferenciando-se apenas pelas suas constantes de velocidade de associação e dissociação. Assim B se associa e dissocia 100 vezes mais lentamente do que C, porém alcança o mesmo nível de inibição no equilíbrio, já que possui a mesma afinidade (medida pela razão k_{-1}/k_{+1}). As curvas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01 e os valores indicados na Figura 3 do artigo original de Motulsky & Mahan (1983). Os diferentes ligantes-testes são comparados através dos seus valores de índice cinético (KRI, *kinetic rate index*), definido pela razão B_{t1}/B_{t2} , onde B_{t1} : ligação específica do radioligante no tempo 1 (t_1); B_{t2} : ligação específica do radioligante no tempo 2 (t_2). Adaptado de Guo e cols. (2013).

Nota-se que o perfil cinético apresentado na Figura 26 corresponde a uma situação ideal, quando as condições experimentais favorecem a clara discriminação entre uma substância que se dissocia mais lentamente do seu receptor do que o radioligante e outra substância que se dissocia mais rapidamente do receptor do que o radioligante. Além disso, como B e C têm a mesma afinidade, as velocidades de associação são também diferentes e favorecem a observação de perfis tão distintos, com um pico no caso de B.

Como discutido no quadro abaixo, nem sempre estas condições são reunidas e perfis muito diferentes podem ser encontrados, permitindo ou não a diferenciação entre ligantes mesmo que tenham tempos de residência diferentes.



Dica 6. Como otimizar as condições experimentais? Para otimizar a diferenciação entre ligantes com tempos de residência diferentes é recomendado usar um radioligante que não forme um complexo estável demais com o receptor, de tal forma que seu tempo de residência seja intermediário em relação às substâncias competidoras a serem testadas (Motulsky & Mahan, 1983). A Figura 27 ilustra esta questão ao mostrar que o perfil das curvas obtidas com duas substâncias-testes que apresentam os mesmos valores de valores de k_{+1} e valores de k_{-1} bem diferentes (por um fator de 100 vezes) pode variar muito em função do radioligante usado.

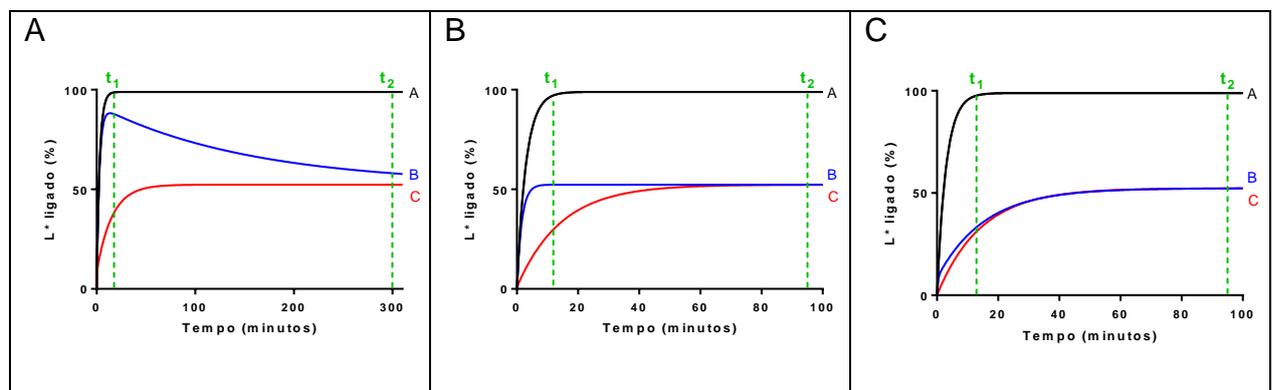


Figura 27. Simulações de ensaio de competição de associação e medida de índice cinética pela técnica de “*dual point*”, para duas substâncias-testes B e C que possuem constantes de velocidade de dissociação diferentes. Nestas simulações usamos os mesmos valores indicados na Figura 26 para o radioligante, ou seja: $k_{+1} = 10^8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$; $k_{-1} = 0,037 \text{ min}^{-1}$ e concentração = 3 nM. A: Caso ideal onde as substâncias-testes B e C apresentam o mesmo valor de k_{+1} ($10^8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), mas diferentes valores de k_{-1} , sendo um deles dez vezes menor (B: $0,0037 \text{ min}^{-1}$) e outro dez vezes maior (C: $0,37 \text{ min}^{-1}$) que o radioligante. Neste caso, como as duas substâncias têm afinidades diferentes, usamos uma concentração 100 vezes maior para C (30 nM) do que para B (0,3 nM) para que o nível de inibição no equilíbrio seja igual.

B: Situação menos favorável onde as substâncias-testes B e C apresentam de novo o mesmo valor de k_{+1} ($10^8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) e valores de k_{-1} diferentes entre si pela mesma diferença de 100 vezes, porém desta vez uma (B) apresenta um valor de k_{-1} igual ao do radioligante e outra (C) um valor 100 vezes superior. Aqui, também, as duas substâncias têm afinidades diferentes de tal forma que usamos uma concentração 100 vezes maior para C (300 nM) do que para B (3 nM) para que o nível de inibição no equilíbrio seja igual. Neste caso, a substância que possui uma constante de velocidade de dissociação 100 vezes menor que a outra (B vs. C) deixa de apresentar o pico presente na Figura A.

C: Situação desfavorável onde as substâncias testes B e C apresentam o mesmo valor de k_{+1} ($10^8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) mas valores de k_{-1} diferentes entre si pela mesma diferença de 100 vezes. Desta vez, porém, as duas apresentam um valor de k_{-1} superior ao radioligante ($0,37$ e 37 min^{-1} para B e C, respectivamente). Aqui também as duas substâncias têm afinidades diferentes de tal forma que usamos uma concentração 100 vezes maior para C (3000 nM) do que para B (30 nM) para que o nível de inibição no equilíbrio seja igual. Nestas condições, não é possível distinguir as diferenças de cinéticas entre as duas substâncias-testes.

Na Figura 28, mostro um exemplo de aplicação da metodologia do “*dual point*” para avaliar a cinética de ligação do haloperidol e da clozapina aos receptores dopaminérgicos do tipo D₂. Para tanto, usamos uma única concentração de cada fármaco, próxima ao seu valor de K_i. Notem que o radioligante então disponível não era o ideal por ter cinética de dissociação muito lenta em relação às substâncias testadas (vide acima, Dica 6). Mesmo assim, foi possível confirmar que a clozapina tem dissociação mais lenta do que o haloperidol, baseando-se na análise estatística dos índices cinéticos (Pompeu e cols., 2015).

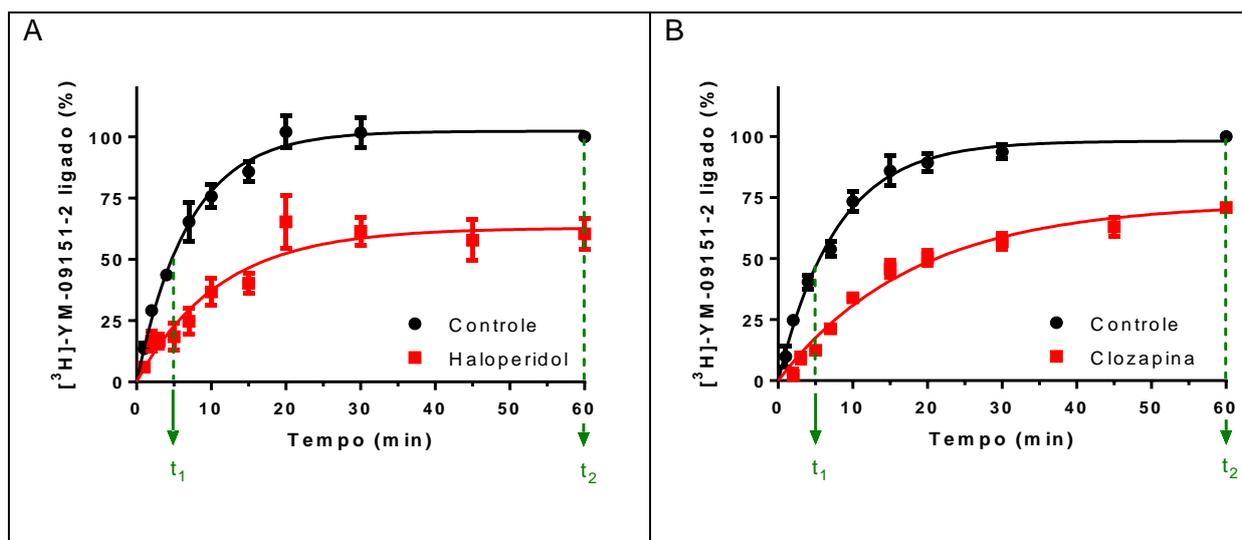


Figura 28. Cinética de ligação do [³H]-YM-09151-2 nos receptores D₂ de corpo estriado de rato na ausência e presença de haloperidol (A) ou clozapina (B). Para o cálculo do índice cinético (KRI), nós dividimos os valores de ligação calculados no tempo de 5 minutos pelos valores no tempo de 60 minutos. As curvas foram obtidas por regressão não linear de acordo com a equação 3 para associação monoexponencial (vide Capítulo 4.4.1.1.). O valor do índice cinético (KRI) para ligação do [³H]-YM-09151-2 na presença de clozapina (0,250 ± 0,015) foi significativamente menor do que na presença de haloperidol (0,360 ± 0,024) e do que na ausência de qualquer ligante competidor (0,510 ± 0,020, controle). Adaptado de Pompeu e cols.(2015).

É importante salientar que é comum observar que os dados de tais ensaios de competição de associação são interpretados somente em termos de diferenças de tempo de residência (ou constantes de velocidade de dissociação) entre os competidores, sem discutir a possível influência de diferenças nas suas constantes de velocidade de associação. Isso talvez se deva ao foco dado no artigo original de Motulsky & Mahan (1983) e depois na versão simplificada (“*dual-point competition association assay*”) proposta por Guo e cols. (2013). Como tal interpretação não me parece óbvia, *a priori*, é oportuno o emprego de simulações para verificar o papel de ambas as constantes de velocidade k_{+1} e k_{-1} de um competidor sobre a cinética de um radioligante. A Figura 27 já indicou que, de fato, é possível distinguir competidores possuindo diferentes valores de k_{-1} , embora tenham os mesmos valores de k_{+1} , pelos perfis diferentes que proporcionam ao medir a cinética de ligação do radioligante com o qual são coincubados. As simulações apresentadas na Figura

29 permitem concluir que as diferenças de cinética de ligação de um radioligante observadas na presença de competidores (B e C) refletem diferenças nas suas constantes de velocidade de dissociação e não de associação. Na realidade, a Figura 29 mostra que não há diferença na cinética de ligação do radioligante quando coincubado com dois competidores que diferem entre si somente pelo valor de k_{+1} .

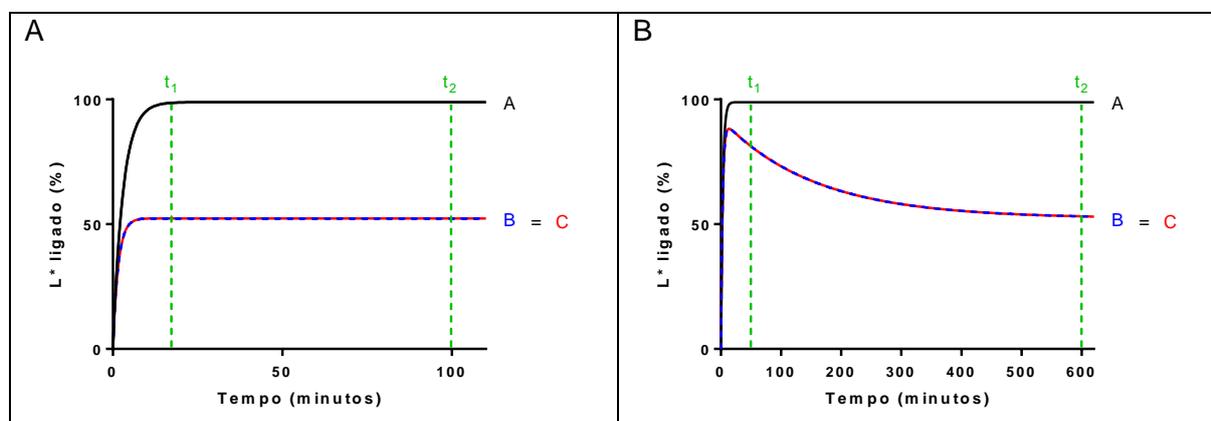


Figura 29. Simulações de ensaio de competição de associação e medida de KRI pela técnica de “*dual point*”, para duas substâncias-testes B e C que possuem constantes de velocidade de associação diferentes. Nestas simulações usamos os mesmos valores indicados na [Figura 27](#) para o radioligante, ou seja: $k_{+1} = 10^8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$; $k_{-1} = 0,037 \text{ min}^{-1}$ e concentração = 3 nM. A: as substâncias-testes B e C apresentam agora o mesmo valor de k_{-1} ($0,037 \text{ min}^{-1}$), idêntico ao radioligante, mas apresentam valores de k_{+1} diferentes entre si por um fator de 100, sendo que B apresenta um valor 10 vezes inferior ao do radioligante ($10^7 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) e C um valor 10 vezes superior ao do radioligante ($10^9 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Aqui também as duas substâncias têm afinidades diferentes de tal forma que usamos uma concentração 100 vezes maior para B (30 nM) do que para C (0,3 nM) para que o nível de inibição no equilíbrio seja igual. Neste caso, a cinética de ligação do radioligante é igual na presença de B e C. B: as substâncias-testes B e C apresentam de novo o mesmo valor de k_{-1} , mas desta vez ele é dez vezes menor do que o do radioligante ($0,0037 \text{ min}^{-1}$). Nesta simulação, B e C apresentam de novo valores de k_{+1} diferentes entre si por um fator de 100, sendo que B apresenta um valor 10 vezes inferior ao do radioligante ($10^7 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) e C um valor 10 vezes superior ao radioligante ($10^9 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), como na Figura A. Aqui também as duas substâncias têm afinidades diferentes de tal forma que usamos uma concentração 100 vezes maior para B (3 nM) do que para C (0,03 nM) para que o nível de inibição no equilíbrio seja igual. Neste caso, também, observamos que a cinética de ligação do radioligante é igual na presença de B e C.

Para uma descrição mais completa dos diferentes protocolos experimentais disponíveis para aferir o tempo de residência tanto em estudos de *binding* como em estudos funcionais, recomendo a revisão feita por Vauquelin (2012).

5.3.3. Aplicações

5.3.3.1. Descoberta de novos fármacos

Este conceito de tempo de residência pode mudar um dos paradigmas da avaliação de novas substâncias dentro do processo de descoberta de novos fármacos, tradicionalmente

baseado em medidas de afinidade de ligação em condições de equilíbrio termodinâmico (vide Capítulo 5.2.2.1.), condições que não são inteiramente válidas no contexto de um sistema aberto onde as concentrações do fármaco na biofase mudam de acordo com processos farmacocinéticos (Copeland, 2016; Swinney e cols., 2015).

Como exemplo de fármaco cujo perfil de atividade terapêutica seria devido ao seu tempo de residência no receptor, podemos citar o candesartan, antagonista do receptor AT1 da angiotensina II. De fato, os seus efeitos prolongados e duradouros de redução da pressão arterial *in vivo*, persistindo mesmo após que sua concentração plasmática se torne indetectável, são atribuídos a uma lenta dissociação do receptor (*apud* Guo e cols., 2014). Por outro lado, em certos casos, pode haver interesse em fármacos que se dissociam rapidamente do seu receptor-alvo, como a clozapina no receptor D₂. Neste caso, de acordo com a teoria do "fast-off" os antipsicóticos atípicos seriam fracamente ligados aos receptores D₂ na sinapse, e assim rapidamente liberados destes, o que explicaria sua menor propensão para induzir efeitos extrapiramidais e hiperprolactinemia, os quais seriam consequências de bloqueio prolongado destes receptores (Kapur e Seeman, 2000).

De acordo com o próprio Copeland na sua recente revisão, várias substâncias já avançaram para ensaios clínicos com base nos esforços para incorporar este conceito de tempo de residência do fármaco no alvo, como um fator-chave para a otimização de compostos-protótipos (Copeland, 2016).

Capítulo 6. ENSAIOS MENOS CLÁSSICOS e APLICAÇÕES

“Não pergunte o seu caminho para alguém que o conhece porque você não poderia se perder”

Rabbi Nahman de Breslev

6.1. EFICÁCIA INTRÍNSECA (BINDING FUNCIONAL)

6.1.1. GPCR – Receptores acoplados à proteína G

6.1.1.1. Princípio

Durante muito tempo considerou-se que a técnica de *binding* tinha como séria limitação o fato de ser capaz de medir a afinidade de um composto a um receptor, mas não sua eficácia intrínseca (Nelson, 1991). Como consequência, ensaios funcionais são tradicionalmente utilizados como ensaios secundários no processo de descoberta de fármacos (Williams & Sewing, 2005) uma vez que a capacidade de discriminar ligantes com diferentes eficácias é de suma importância para fins terapêuticos (agonistas plenos, agonistas parciais ou antagonistas). Apesar desta crença inicial, protocolos mais sofisticados de “*binding* funcional” foram desenvolvidos para distinguir agonistas de antagonistas nos receptores acoplados à proteína G (GPCR). Estes métodos, descritos abaixo, baseiam-se na capacidade de formação de um complexo entre o receptor e alguma proteína G, e podem ser explicados à luz do modelo do complexo ternário estendido (Fig. 30).

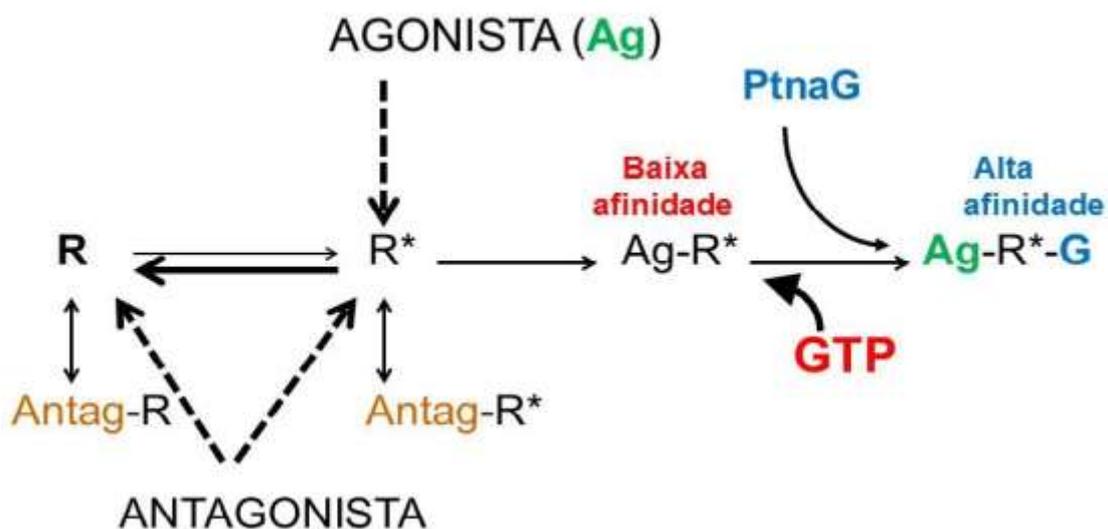


Figura 30. Representação simplificada do modelo de “complexo ternário estendido” para receptores metabotrópicos, onde o agonista liga-se preferencialmente ao receptor no estado ativo (R*), formando o complexo ternário (Ag-R*-G) de alta afinidade na presença de proteína G. A formação deste complexo é favorecida pela presença de cátions divalentes tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} . Por outro lado, o GTP desloca o equilíbrio para o estado de menor afinidade, sem proteína G (Ag-R*). Os antagonistas se ligam com igual afinidade em ambos os estados ativo (R*) e inativo (R) do receptor, mas não formam complexos ternários com a proteína G, razão pela qual sua afinidade não é alterada pela presença de GTP (Noël e cols., 2014).

6.1.1.2. *GTP-shift*

O trabalho pioneiro do grupo de Lefkowitz no receptor β -adrenérgico mostrou que o perfil das curvas de competição utilizando um antagonista como radioligante era diferente de quando se utiliza agonistas ou antagonistas como competidores (De Lean e cols., 1980). No modelo proposto por estes autores (e versões posteriores tais como o modelo do complexo ternário estendido descrito na Figura 30), o agonista tem uma baixa afinidade pelo estado inativo do receptor e uma elevada afinidade pelo estado ativo. O grupo do Lefkowitz desenvolveu o método do *GTP-shift*, em que a adição de GTP dificulta a formação do complexo ternário (Ag-R*-G), deslocando a curva de competição de agonistas, mas não antagonistas, para a direita, como resultado da menor afinidade dos agonistas pelo receptor desacoplado (Ag-R*) (Lefkowitz e cols., 1982). Desde então, vários trabalhos mostraram que a maioria dos GPCR exibe um *GTP-shift* (Kenakin, 2009) e que a sua amplitude depende da eficácia intrínseca do agonista, mas também do tipo de proteína G envolvido (Jiang e cols., 2001). Como ilustração, apresento na Figura 31 dados obtidos no processo de validação deste ensaio para o receptor 5-HT_{1A}.

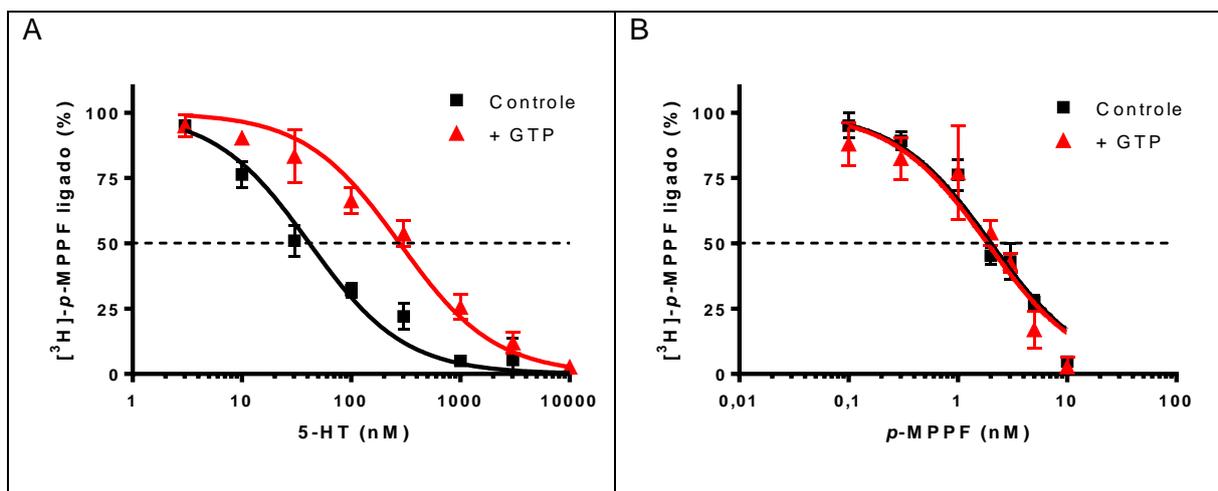


Figura 31. Ensaio de *GTP-shift* para o receptor 5-HT_{1A} (preparação membranas de hipocampo de rato). As curvas de competição foram realizadas utilizando o radioligante antagonista seletivo para o receptor 5-HT_{1A} ([³H]-p-MPPF) na presença ou ausência de GTP 1 mM, em meio padrão não contendo cátions divalentes. A. Para o agonista endógeno (5-HT), a presença de GTP deslocou a curva de competição para direita. B. Para o antagonista (p-MPPF), as curvas na presença e ausência de GTP ficaram sobrepostas, indicando a falta de *GTP-shift*. Curvas médias de 3-4 experimentos pareados independentes, realizadas em triplicata. Adaptado de Noël e cols., 2014.

6.1.1.3. *Razão de K_i*

Este método baseia-se na diferença de afinidade do fármaco competidor quando se utiliza um antagonista ou um agonista como radioligante, já que estes marcam o estado de baixa afinidade e de alta afinidade do receptor, respectivamente (Assie e cols., 1999). Para otimizar este método, preconiza-se fortemente adicionar GTP quando se usa o antagonista como radioligante e cátions divalentes quando se usa o agonista como radioligante, como ilustrado no esquema da [Figura 30](#).

Adotamos esta estratégia para a validação deste ensaio no caso do receptor 5-HT_{1A}, realizando experimentos de competição com um radioligante agonista, em meio contendo cátions divalentes, e experimentos com um radioligante antagonista na ausência de cátions divalentes, mas na presença de GTP (Fig. 32). Baseado nos valores de CI₅₀, calcula-se os valores de K_i (vide Capítulo 5.2.1., [Equação 8](#)) nas duas condições, para obter as razões de K_i, para cada competidor. Como detalhado no artigo (Noël e cols., 2014), obtivemos razões de K_i muito diferentes para o agonista pleno 5-HT (77) e para o antagonista *p*-MPPF (0,25), permitindo assim uma boa discriminação entre agonistas plenos, parciais e antagonistas.

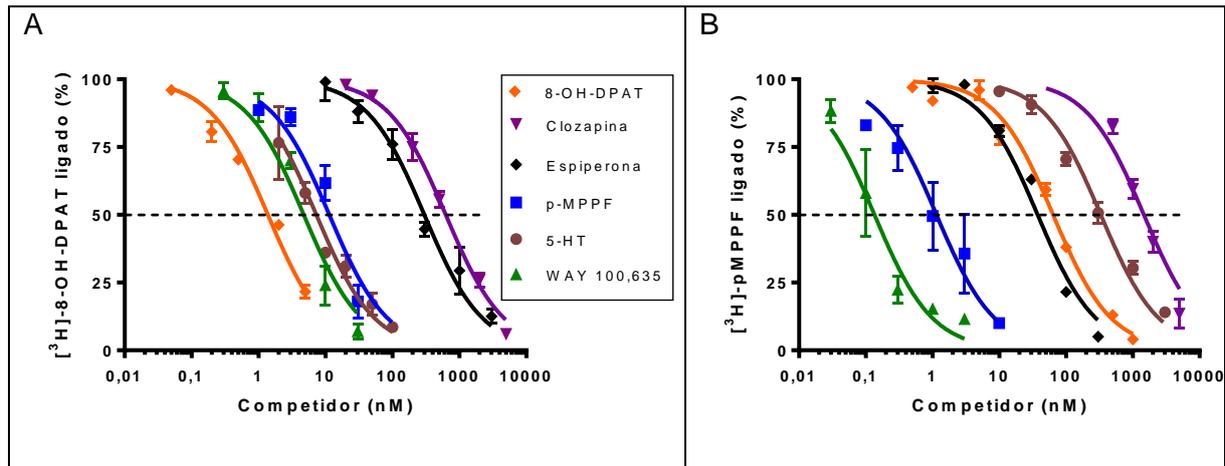


Figura 32. Curvas de competição para ligação ao receptor 5-HT_{1A} por diversas substâncias utilizadas como padrões. A: radioligante agonista [³H]-8-OH-DPAT em meio contendo 1 mM CaCl₂ e 1 mM MnCl₂. B: radioligante antagonista [³H]-*p*-MPPF em meio contendo 1 mM GTP e sem cátions divalentes. Curvas médias de 2-3 experimentos independentes realizados em triplicata. Adaptado de Noël e cols., 2014.

Como demonstrado na Figura 33, houve uma excelente correlação entre os resultados obtidos com os dois métodos de *binding* descritos acima (*GTP-shift* e razão de K_i), pelo menos nas condições nas quais realizamos estes ensaios no receptor 5-HT_{1A}.

Embora menos sensível, o ensaio de *GTP-shift* apresentou várias vantagens como rapidez, economia e menor risco de viés experimental (vide discussão em Noël e cols., 2014).

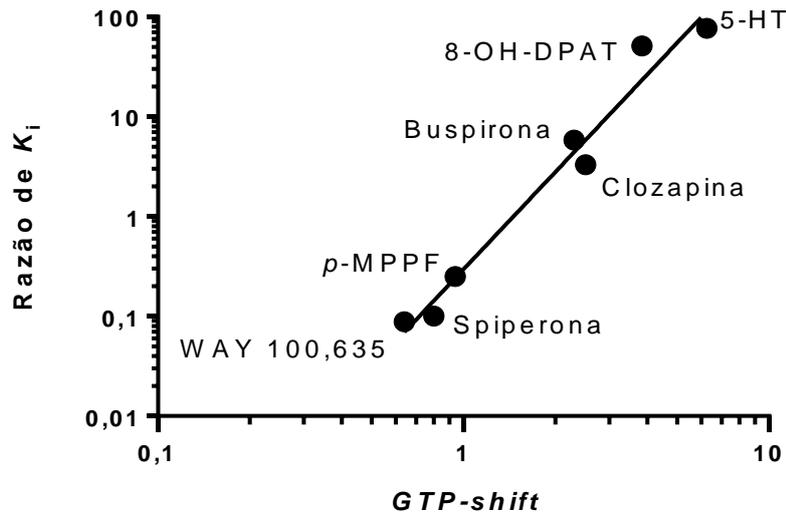


Figura 33. Correlação entre os ensaios de *GTP-shift* e razão de K_i para estimar a eficácia intrínseca de sete ligantes no receptor 5-HT_{1A} (preparação membranar de hipocampo de rato). Teste de correlação de Spearman ($r = 0,964$; $p = 0,0028$). Adaptado de Noël e cols., 2014.

6.1.1.4. Binding de [³⁵S]-GTPγS

O princípio deste método baseia-se na etapa-chave de ativação de uma proteína G por agonistas de GPCR, ou seja, a troca de nucleotídeo guanílico (GDP por GTP) na subunidade α da proteína G. Esta troca pode ser monitorada pela medição da ligação de [³⁵S]-GTPγS, um análogo do GTP resistente à atividade GTPásica da subunidade α da proteína G. Um aspecto interessante deste ensaio é que ele mede um evento muito precoce da cascata de sinalização (correspondendo ao “estímulo” como definido por Stephenson – vide Capítulo 1.1.), de tal forma que ele é menos sujeito a amplificação ou influência de outros fatores intracelulares do que medidas mais distais de efeito, como contração ou regulação gênica ou, até mesmo, aumento de níveis intracelulares de AMPc ou Ca²⁺ (Milligan, 2003).

Este método é utilizado com sucesso desde o início da década de 1990 para o *screening* farmacológico (Strange, 2010), especialmente para receptores acoplados às proteínas G da família Gi (Milligan, 2003; Odagaki & Toyoshima, 2007). Apesar de mais complicadas, existem hoje adaptações desta técnica que permitem estender sua utilização para qualquer GPCR, mesmo acoplado à proteína G que não seja Gi (Milligan, 2003). Assim sendo, hoje em dia, este método é considerado o padrão-ouro para determinação da eficácia de ligantes em GPCR no que diz respeito aos métodos de *binding* funcional. Como ilustração, apresento na Figura 34 os dados que obtivemos na validação deste ensaio para o receptor 5-HT_{1A}.

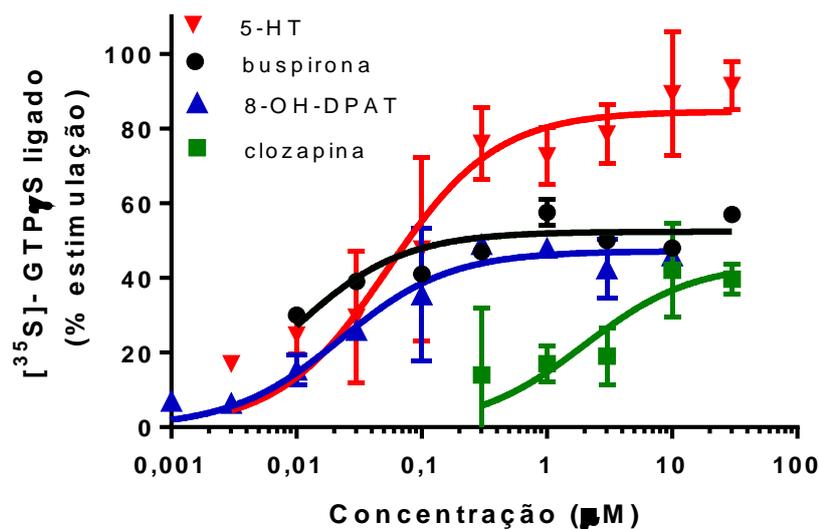


Figura 34. Ensaio de [³⁵S]-GTPγS para agonistas plenos e parciais do receptor 5-HT_{1A} (preparação membranar de hipocampo de rato). Os efeitos são representados como % de estimulação em relação à ligação basal de [³⁵S]-GTPγS. As curvas representam as médias de três experimentos realizados em triplicata. Adaptado de Noël e cols., 2014.

6.1.1.5. Na⁺-shift

Mencionei o fato de que o ensaio de GTP-*shift* foi bem sucedido para a maioria dos GPCR, mas nem todos (Capítulo 6.1.1.2.). Em tais situações, como no caso do receptor A_{2A}, é salutar procurar alternativas de *binding* funcional para se avaliar a eficácia intrínseca de ligantes. Uma opção racional é o Na⁺-*shift* que se baseia nos efeitos diferenciais que cátions divalentes e Na⁺ exercem, já que o Na⁺ pode ser considerado um modulador alostérico negativo em relação à ligação e ativação de agonistas, em muitos GPCR (Strasser e cols., 2015). A Figura 35 mostra o resultado do ensaio que propusemos para o receptor A_{2A}, baseado na diferença de afinidade do agonista na presença de MgCl₂, que favorece a formação do complexo ternário (vide esquema Figura 30), e na presença de alta concentração de Na⁺, que desestabiliza tal complexo ternário. Com um agonista, a presença de Na⁺ desloca a curva de competição para direita (Na⁺-*shift*) enquanto isso não ocorre com um antagonista, já que este é incapaz de formar um complexo ternário.

A quantificação deste efeito se faz pelo cálculo da razão entre os valores de CI₅₀ medidos no meio contendo NaCl 100 mM e os valores medidos no meio contendo MgCl₂ 50 mM. Assim sendo, podemos concluir que o Na⁺-*shift* é um método alternativo rápido, barato e eficiente para distinguir antagonistas de agonistas parciais e agonistas plenos, pelo menos no caso do receptor A_{2A}.

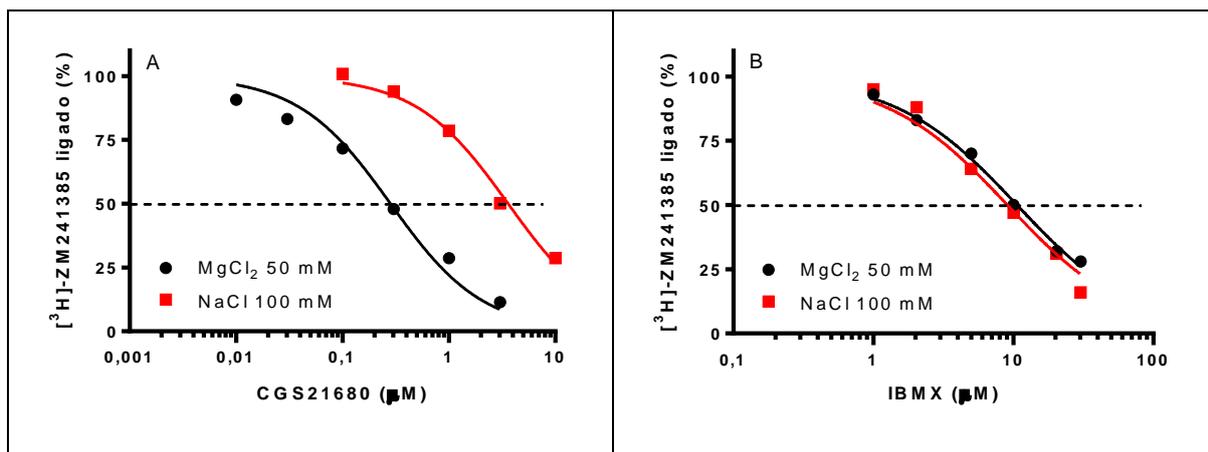


Figura 35. Ensaio de Na^+ -shift. As curvas de competição foram realizadas em preparação membrana de estriado de rato utilizando um radioligante antagonista seletivo para o receptor A_{2A} ($[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$). As curvas de competição do agonista pleno (A: CGS21680) e do antagonista (B: IBMX) foram realizadas em meio contendo MgCl_2 50 mM ou NaCl 100 mM. Curvas médias de 3-4 experimentos pareados, realizadas em triplicata. Adaptado de Noël e do Monte, 2017.



Dica 7. Seletividade funcional e *binding* funcional para determinação de eficácia intrínseca em GPCR.

Vale salientar que os ensaios funcionais apresentados acima para estimar a eficácia intrínseca de ligantes para GPCR tem uma limitação devido ao conceito de seletividade funcional (*agonismo tendencioso*). Segundo este conceito, diferentes ligantes podem induzir (ou selecionar) conformações diferentes do receptor, únicas e específicas do ligante, que frequentemente podem resultar em ativação diferencial das vias de transdução de sinal associadas a este receptor (Urban e cols., 2007). O problema é que para os receptores 7TM (GPCR, que compreendem 7 α -hélices que atravessam a membrana), o acoplamento pode se fazer não somente com proteínas G (razão do nome original de GPCR) como também com outras proteínas citosólicas, entre as quais as β -arrestinas são as mais bem descritas. Como os ensaios de *binding* funcional apresentados acima dependem da formação de complexo ternário entre agonista, receptor e proteína G, eles não são capazes de estimar a eficácia para ativar vias de sinalização independentes de proteína G. Ademais, este conceito nos obriga a rever o conceito de eficácia intrínseca e a nomenclatura dos fármacos. De fato, classicamente (Furchgott, 1966 *apud* Kenakin, 2013), a eficácia intrínseca é uma medida do estímulo produzido pela ocupação de um receptor, sendo um parâmetro independente do sistema, ou seja, constante para um ligante num determinado receptor, independentemente donde este receptor é expresso. Agora, sabemos que determinados ligantes de um receptor podem ser antagonistas de uma determinada via de sinalização e, ao mesmo tempo, agonistas de outra via relacionada a este mesmo receptor (Kenakin & Miller, 2010). Por outro lado, novas oportunidades surgem em função da possibilidade de desenhar ligantes com seletividade para uma determinada via de sinalização, o que pode nos levar a descoberta de fármacos realmente inovadores pela possibilidade de separar efeitos benéficos de efeitos adversos originalmente considerados intrinsecamente ligados por depender da ativação ou inibição do mesmo receptor.

6.1.2. Receptores ionotrópicos

Apesar de ser bem menos comum do que para os GPCR, podemos pelo menos citar um caso clássico de *binding* funcional para um receptor ionotrópico.

6.1.2.1. Receptor benzodiazepínico e GABA-shift

As benzodiazepinas são moduladores alostéricos (vide Capítulo 6.2. _) do receptor GABA_A, um canal iônico ativado por ligante que medeia o fluxo de íons cloreto. As benzodiazepinas clássicas utilizadas clinicamente como ansiolíticos aumentam a afinidade do GABA pelo seu sítio ortostérico, ao se ligarem ao sítio benzodiazepínico, um sítio alostérico presente no receptor heteropentamérico. Da mesma forma, o GABA aumenta a afinidade das benzodiazepinas para seu sítio de ligação. No ensaio de GABA-*shift*, como originalmente proposto por Braestrup e cols. (1984), o ensaio de competição para a ligação do [³H]-flunitrazepam (agonista benzodiazepínico) é realizado na ausência e na presença de GABA. Enquanto o GABA não altera a afinidade de antagonistas, ele desloca para esquerda as curvas de competição de agonistas. Apesar dos deslocamentos serem sempre relativamente pequenos (2 e 0,5 para os agonistas e agonistas inversos, respectivamente), o valor preditivo deste ensaio foi confirmado por Visser e cols. (2003) ao relatar uma correlação linear altamente significativa entre a eficácia intrínseca *in vivo* e o valor do GABA-*shift* em ensaio de *binding in vitro*.

Além dos exemplos da literatura citados acima, posso relatar nossa experiência bem sucedida ao aplicar este ensaio para estudar uma substância sintética, o cumestano PCALC36 (Lopes e cols., 2004). Apesar dos valores pequenos de GABA-*shift*, fomos capazes de propor que o PCALC36 se comportava como agonista inverso (GABA-*shift* para direita), já que respondia ao GABA de forma idêntica ao DMCM usado como agonista inverso padrão, e de forma oposta ao flunitrazepam, usado como agonista padrão, hipótese depois confirmada por estudo eletrofisiológico (Lopes e cols., 2004).

6.2. ALOSTERISMO

6.2.1. Fundamento teórico

O termo “alostérico” foi inicialmente proposto para descrever o fenômeno de interação entre dois sítios topograficamente distintos de uma mesma enzima, através da transmissão de modificação conformacional (Monod e cols., 1965). Quinze anos mais tarde, Lefkowitz aplicou este conceito de interação alostérica para explicar a transdução de sinal no caso dos receptores metabotrópicos (De Lean e cols., 1980), como discutido acima (Figura 30, modelo ternário para GPCR). Há atualmente um grande interesse por este tema, quer seja na academia ou nas empresas farmacêuticas, por causa do grande potencial em se desenvolver fármacos mais seletivos e/ou mais seguros (Wooten e cols., 2013). *A priori*, haveria vantagens em buscar moduladores alostéricos em vez de fármacos que se ligam no sítio ortostérico de um receptor, em termos de seletividade e segurança (May e cols., 2004):

1. **Seletividade:** haveria mais chance de se conseguir fármacos seletivos atuando em sítios alostéricos do que em sítios ortostéricos, já que as estruturas destes são geralmente muito

conservadas entre diferentes subtipos de um mesmo receptor, como já bem ilustrado no caso dos receptores muscarínicos (May e cols., 2004).

2. **Segurança:** é de se esperar que um modulador alostérico de receptor neuronal tenha um perfil mais seguro por duas razões: ele teria um efeito mais fisiológico por manter o padrão espacial e temporal do neurotransmissor liberado de forma descontínua; por outro lado, seu efeito seria limitado a um determinado nível, independentemente do aumento da dose, já que somente modula o efeito do agonista endógeno (“efeito teto” que explica a maior segurança das benzodiazepinas em relação aos barbitúricos, capazes de abrir o canal de cloreto do receptor GABA_A, por si mesmos, independentemente da presença de GABA). Para um breve resumo sobre o tema, consultem a matéria publicada na *Newsletter* da SBFTE, disponível em: <http://www.sbfte.org.br/wp-content/uploads/2017/05/8.Alosterismo.pdf>

6.2.2. Aspecto prático

6.2.2.1. Tipo de ensaios

Geralmente, a suspeita de efeito alostérico surge em função de inibição parcial (modulador alostérico negativo?) ou aumento (modulador alostérico positivo?) da ligação de um radioligante ortostérico provocada por uma substância-teste em um ensaio típico de competição. Vários ensaios de *binding* podem ser utilizados para detectar moduladores alostéricos, cada um com suas vantagens e desvantagens (May e cols., 2004). Entre estes, a forma mais comum e sensível para se detectar um efeito alostérico é de se comparar a cinética de dissociação de um radioligante ortostérico (Capítulo 4.4.1.2.) na ausência e presença da substância-teste. Caso a substância-teste seja um modulador alostérico negativo atuando sobre a afinidade do ligante ortostérico, é de se esperar que ela aumente a velocidade de dissociação do radioligante, como ilustrado na Figura 36 (A).

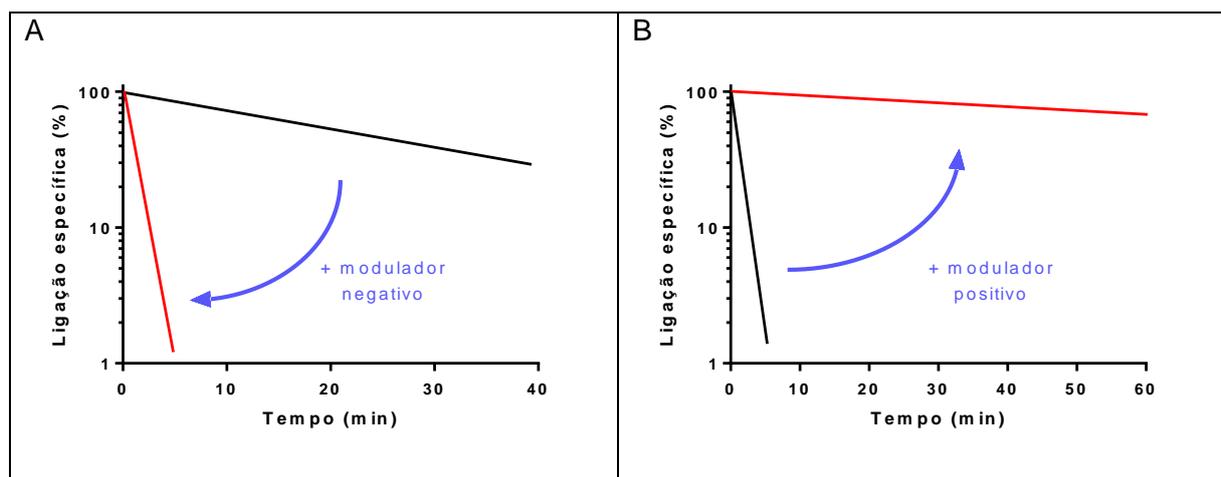


Figura 36. Efeito de moduladores alostéricos sobre a cinética de dissociação de um radioligante ortostérico. A: efeito de um modulador alostérico negativo sobre a cinética de dissociação de um ligante ortostérico. Esta simulação foi feita para ilustrar o efeito da 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida sobre a cinética de dissociação da [³H]-ioimbina, no receptor α_2 humano. B: efeito de um modulador alostérico positivo sobre a cinética de dissociação de um ligante ortostérico. Esta simulação foi feita para ilustrar o efeito do alcurônio sobre a dissociação de [³H]-NMS, no receptor muscarínico M₂ humano. Inspirado de May e cols., 2004.

Esta situação foi observada para o efeito da 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida sobre a dissociação da [³H]-ioimbina, no receptor α_2 humano (apud May e cols., 2004). Por outro lado, caso a substância-teste seja um modulador alostérico positivo atuando sobre a afinidade do ligante ortostérico, é de se esperar que ele diminua a velocidade de dissociação do radioligante, como ilustrado na Figura 36 (B). Esta situação foi observada para o efeito do alcurônio sobre a dissociação de [³H]-NMS, no receptor muscarínico M₂ humano (apud May e cols., 2004).

Como exemplo, apresento na Figura 37 o resultado de um ensaio visando avaliar se o efeito inibidor que o cumestano PCALC36 exerce sobre a ligação do [³H]-flunitrazepam em sinaptosomas de cérebro de rato seria fruto de um efeito alostérico negativo. Como podemos ver, neste caso, o PCALC36 não alterou a cinética de dissociação do radioligante ortostérico.

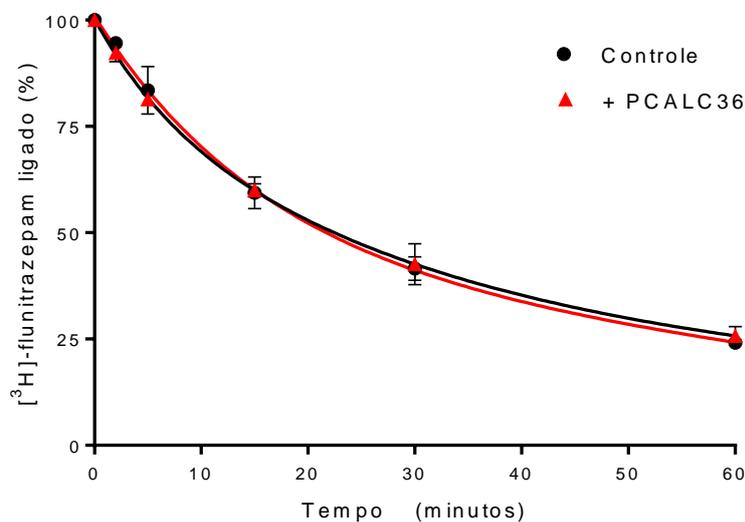


Figura 37. Influência do PCALC36 sobre a cinética de dissociação do [³H]-flunitrazepam em sinaptosomas de rato. Após 90 min de incubação, a dissociação foi iniciada por diluição isotópica com 300 nM de flunitrazepam não marcado, sozinho (controle) ou na presença de 30 μ M PCALC36. Adaptado de Lopes e cols., 2004.



Dica 8. Limitação. É importante ressaltar que esta técnica é limitada aos casos onde o modulador alostérico afeta a constante de velocidade de dissociação do ligante ortostérico (k_{-1}). De fato, é possível imaginar que um modulador alostérico altera a afinidade do ligante ortostérico (K_d) por afetar, somente, a sua constante de velocidade de associação (k_{+1}). Há também limitação para detectar um efeito alostérico que altera somente a eficácia intrínseca do ligante ortostérico e não sua afinidade, como foi reportado no caso do antagonista alostérico CPCCOEt do receptor glutamatérgico mGlu1 (Litschig e cols., 1999).

6.2.2.2. Escolha do radioligante e da fonte de receptor (espécie)

No caso de estudo de *binding* visando à detecção de efeito alostérico, há precauções adicionais a serem tomadas em função da grande variabilidade já relatada em função da natureza do radioligante usado e da espécie.

- Dependência do radioligante (*Probe dependence*): a extensão e sentido de um efeito alostérico podem variar com a natureza do ligante ortostérico utilizado como sonda. Assim, o mesmo modulador alostérico pode ser positivo, negativo ou neutro dependendo da sonda ortostérica ou condições de ensaio. Idealmente, devemos utilizar o agonista endógeno como radioligante do sítio ortostérico.

- Dependência da espécie: a escolha da espécie animal é mais crítica ainda do que em estudos diretos do efeito de substâncias-testes, já que há relatos de efeito alostérico em receptor muscarínico de tipo M4 humano, mas não de camundongo, por exemplo (Suratman e cols., 2011).

6.3. DETERMINANTES TERMODINÂMICOS DA AFINIDADE: ΔH E ΔS

6.3.1. Princípio

A afinidade de um fármaco a um receptor define a força da interação entre as duas espécies e é diretamente relacionada à energia livre de Gibbs (Raffa & Porreca, 1989, equação 10). Como demonstrado pela equação 11, as forças que controlam a afinidade de um fármaco ao receptor são termodinâmicas, sendo que a diminuição de entalpia e o aumento de entropia favorecem a formação do complexo fármaco-receptor (diminuição da energia livre de Gibbs).

$$\Delta G^0 = - RT \ln K_A$$

Equação 10

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Equação 11

Onde: G^0 = energia livre de Gibbs; K_A = constante de equilíbrio de associação ($1/K_d$); H^0 = entalpia; T = temperatura absoluta em graus Kelvin; S^0 = entropia.

Em farmacologia, a variação de entalpia (ΔH^0) é geralmente interpretada como reflexo de forças intermoleculares entre o ligante e o receptor (sobretudo ligações de hidrogênio e de van der Waals) enquanto que a variação de entropia (ΔS^0) reflete o rearranjo (desordem) das moléculas de água ou desdobramento da proteína. Como ilustrado no esquema da Figura 38, a mudança de entalpia que acompanha a formação do complexo fármaco-receptor depende do balanço das mudanças que ocorrem em termos de interações

químicas intra- e intermoleculares. Por outro lado, a mudança de entropia se deve, sobretudo, ao processo de dessolvatação do fármaco e da proteína receptora.

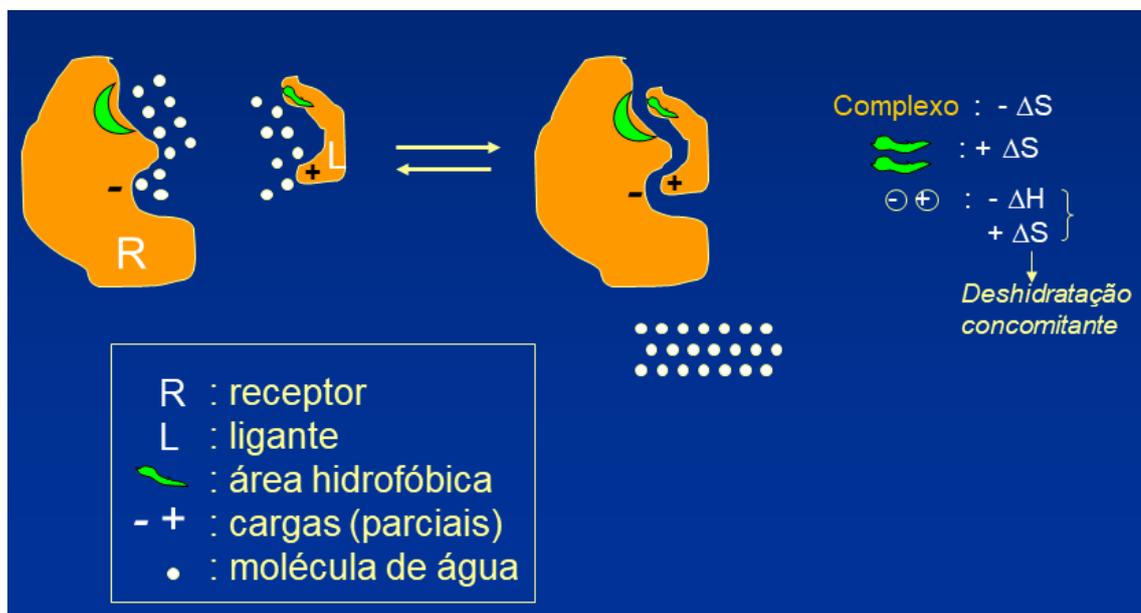


Figura 38. Eventos moleculares e termodinâmicos que determinam a ligação de fármacos a receptores. Adaptado de Testa e cols., 1987.

Dica 9. Docking. Apesar de serem cada vez mais usadas no processo de descoberta de novos candidatos a fármacos, as técnicas atuais de modelagem molecular carecem de boas ferramentas para obter estimativas confiáveis das mudanças de entropia relacionadas à formação do complexo ligante-receptor, ao contrário das previsões das mudanças de entalpia que ocorrem com a formação do complexo. Desta forma, podemos entender porque o *docking* pode ser bem sucedido na previsão de afinidade nos casos onde as mudanças de entalpia são as que determinam a afinidade dos ligantes a um receptor enquanto que o *docking* pode falhar quando é o aumento de entropia que determina a afinidade (Braga e cols., 2014).

6.3.2. Aspecto prático

O *binding* é uma das técnicas que permitem a aferição experimental dos fatores termodinâmicos que determinam a afinidade de um ligante a um receptor. Para tanto, deve-se realizar curvas de saturação no equilíbrio (vide Capítulo 4.3.) em diferentes temperaturas, geralmente pelo menos cinco, por exemplo entre 4°C e 37°C. De posse dos valores de K_A obtidos a cada temperatura, podemos estudar a relação entre os valores da constante de equilíbrio e a temperatura, de acordo com o gráfico proposto por van't Hoff (Fig. 39), baseado na equação do mesmo nome (Equação 12).

$$\ln K_A = -\Delta H^0 / RT + (\Delta S^0 / R)$$

Equação 12

Onde: K_A = constante de equilíbrio ($1/K_d$); H^0 = entalpia; T = temperatura absoluta; R = constante de gases perfeitos. S = entropia.

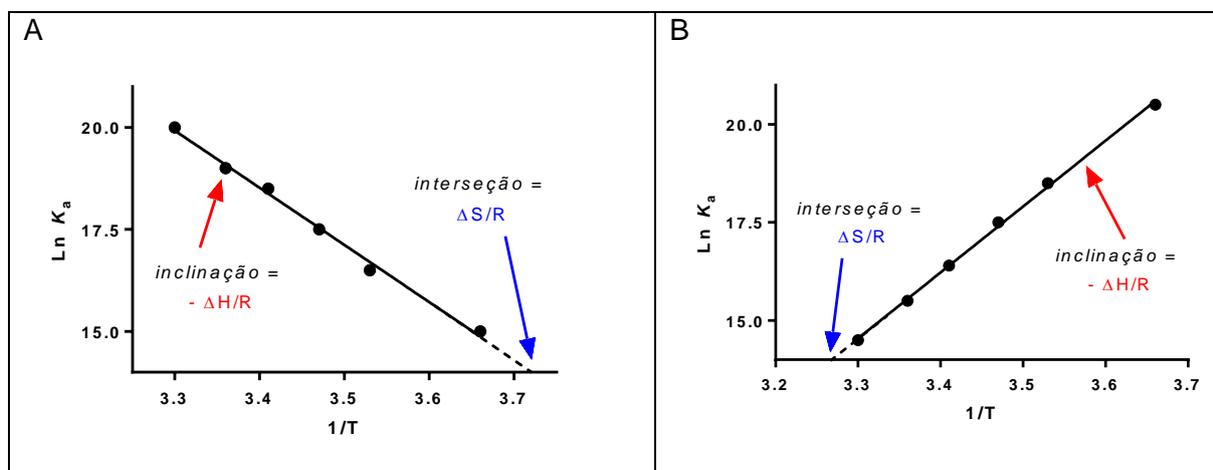


Figura 39. Gráficos de van 't Hoff para determinação dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a formação do complexo fármaco-receptor. Exemplos teóricos para uma reação endotérmica (A: ΔH positivo) e uma reação exotérmica (B: ΔH negativo). Nestas simulações, a afinidade do ligante variou entre 5 nM e 300 nM, entre as temperaturas de 4 a 30°C (273-303°K). Estas grandes variações foram escolhidas para maior clareza dos gráficos. Nota-se que o gráfico de van 't Hoff é linear com base no pressuposto de que a entalpia e a entropia são constantes quando há mudanças de temperatura, o que nem sempre é o caso.



Dica 10. Microcalorimetria (calorimetria de titulação isotérmica). Esta técnica tem a grande vantagem de medir diretamente a troca de calor (variação de entalpia) que ocorre durante a formação do complexo fármaco-receptor, o que permite deduzir o valor da variação de entropia. Por outro lado, esta técnica ainda é relativamente complexa para poder ser usada de rotina em processos de *screening* e é também sensível a presença de solvente como etanol e DMSO.

6.3.3. Aplicações

6.3.3.1. Desenvolvimento de fármacos: diferentes autores propuseram que ligantes com entalpias mais negativas seriam melhores para iniciar o processo de otimização de compostos-protótipos (Freire, 2009).

6.3.3.2. Discriminação termodinâmica: existem evidências de que é possível distinguir a ligação de antagonistas e agonistas de GPCR baseando-se em parâmetros termodinâmicos como entalpia e entropia. Este fenômeno, chamado de “discriminação termodinâmica”, foi relatado inicialmente para o receptor β -adrenérgico (Weiland e cols., 1979) e depois para receptores glicinérgicos, GABA_A, 5-HT₃, nicotínico e adenosinérgicos A₁, A_{2A} e A₃ (Gessi e cols., 2008). No caso do receptor A_{2A}, a ligação de agonistas derivados da adenosina é totalmente determinada por ganho de entropia, enquanto a ligação de antagonistas derivados de xantina é favorecida pela diminuição de entalpia (Borea e cols., 1995). Porém, a

discriminação termodinâmica não é um fenômeno geral, já que não foi verificado para alguns receptores como D₂, 5-HT_{1A} e H₁ (Borea e cols., 2000; Strasser & Wittmann, 2012).

Nota-se que é preciso ter o cuidado de garantir uma grande variedade estrutural dos ligantes a serem usados em estudos termodinâmicos porque diferenças observadas entre agonistas e antagonistas poderiam ser relacionadas à estrutura química dos ligantes e não às suas eficácias intrínsecas (Wittmann e cols., 2009).

6.4. CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE RECEPTORES ORTÓLOGOS

6.4.1. Princípio

Classicamente, a caracterização farmacológica de receptores teve papel essencial na descoberta de novos subtipos de receptores, bem antes de existir as ferramentas de biologia molecular que hoje tem papel central na determinação de homologia entre receptores. A caracterização farmacológica de receptores através de sequência de afinidade apresentada por uma série de agonistas e, sobretudo, antagonistas em estudos de *binding* de competição (Capítulo 5.2.1.) continua sendo útil para determinar a identidade de subtipos de receptores em diferentes tecidos ou mesmo entre diferentes espécies animais. Receptores ortólogos são frutos de genes em diferentes espécies que evoluíram a partir de um gene ancestral comum, por especiação. Normalmente, ortólogos retêm a mesma função no decurso da evolução e espera-se que tenham uma sensibilidade semelhante para uma série de substâncias.

6.4.2. Aspecto prático

Uma das formas de se avaliar o parentesco entre receptores, e daí identificar quais receptores podem ser considerados ortólogos, é verificar se existe correlação entre as afinidades apresentadas por diferentes ligantes nas espécies em estudo. Idealmente, deveríamos aplicar um teste paramétrico de correlação, como o teste de Spearman, sobre os valores de pK_i observados nas duas espécies para uma série de ligantes (para discussão sobre testes de correlação, vide [Dica 11](#)).

6.4.3. Aplicações

Como exemplo de tal aplicação, relatarei o que fizemos para esclarecer a possível relação ortóloga que podia existir entre os sítios de ligação do [³H]-PK11195 que detectamos no *Schistosoma mansoni* e os sítios de ligação presentes em rim de rato (receptor benzodiazepínico “periférico”). A Figura 40 nos permitiu verificar que a pequena população de receptores marcados com alta afinidade pelo [³H]-PK111-95 no *S. mansoni* tinha farmacologia semelhante à farmacologia dos receptores benzodiazepínicos periféricos de rato, e assim propor que eram receptores ortólogos destes, mas não dos receptores benzodiazepínicos centrais marcados com [³H]-flunitrazepam (Noël e cols., 2007).

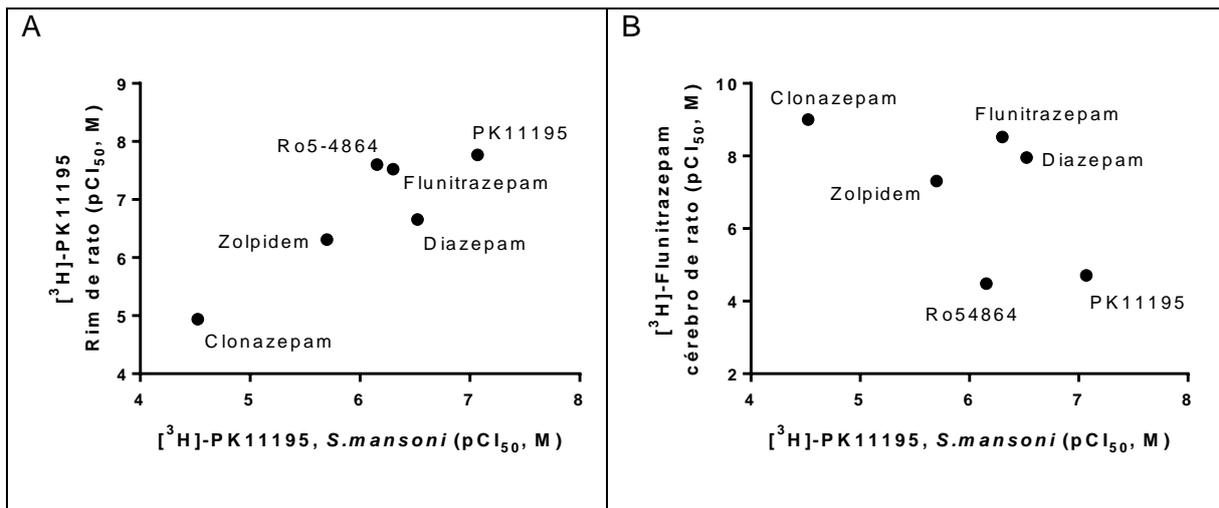


Figura 40. Perfil farmacológico dos sítios de ligação do [³H]-PK11195 no *Schistosoma mansoni*. A: comparação entre valores de pCI₅₀ obtidos em ensaios de competição usando-se [³H]-PK11195 para seis ligantes dos receptores benzodiazepínicos centrais ou periféricos, medidos em preparações de *S. mansoni* e de rim de rato (rico em receptores benzodiazepínicos periféricos). Teste de correlação de Pearson: $r^2 = 0,798$; $p = 0,016$. B: comparação entre valores de pCI₅₀ dos mesmos ligantes obtidos em ensaios de competição usando-se [³H]-PK11195 em preparações de *S. mansoni* e [³H]-Flunitrazepam em preparação de cérebro de rato (rico em receptores benzodiazepínicos centrais). Teste de correlação de Pearson, $r^2 = 0,338$; $p = 0,226$. (Representação e análise original, baseada nos dados retirados de Noël e cols., 2007).



Dica 11. Testes de correlação. Um coeficiente de correlação mede a extensão em que duas variáveis tendem a mudar em conjunto. Os dois testes de correlação mais populares são os testes de Pearson e Spearman. A correlação de Pearson avalia a relação linear entre duas variáveis contínuas enquanto a correlação de Spearman avalia a relação monotônica entre duas variáveis ordinais (*ranqueadas, por postos*). Sendo assim, qual dos dois deve ser usado nos casos onde se quer avaliar uma possível correlação entre dados medindo afinidade ou potência (como no exemplo acima, onde são avaliados valores de CI₅₀)? Neste caso é importante lembrar que os cálculos de correlação de Pearson baseiam-se na suposição de que os valores X e Y são retirados de populações que seguem uma distribuição Gaussiana (normal), pelo menos aproximadamente, o que não é o caso com dados relacionados à afinidade/potência (vide **Capítulo 8**) que obedecem a uma distribuição log-normal. A correlação não paramétrica de Spearman não faz qualquer suposição sobre a distribuição dos valores, pois os cálculos são baseados em classificações (ranqueamentos, postos) e não nos valores reais. Portanto nós temos duas opções: 1. Usar o teste não paramétrico de Spearman para trabalhar com os valores de CI₅₀. 2. Usar o teste paramétrico de Pearson para trabalhar com os valores de CI₅₀ após terem sido transformados em logaritmos, usando-se, por exemplo, valores de pCI₅₀ ($-\log CI_{50}$), para poder se beneficiar do maior poder deste teste paramétrico (como fizemos na Figura 40). No caso da Figura 32, utilizamos o teste de Spearman por prudência, ao desconhecer o tipo de distribuição do parâmetro “GTP-*shift*” (e aí, não precisamos transformar os valores de K_i em logaritmos).

Nota-se que nestes dois casos (Figura 33 e Figura 40), foi traçada uma linha (reta) quando a correlação era estatisticamente significativa, para facilitar a análise visual, e não ficar diferente das representações comumente encontradas em artigos científicos da nossa

área. Vale ressaltar que o mais correto seria representar os dados simplesmente na forma de gráfico de dispersão (*scatter plot*), sem traçar nenhuma reta. De fato, tais retas são geralmente traçadas conforme análise dos dados por regressão linear, o que não é correto em casos como das nossas figuras. Não podemos confundir os conceitos de correlação e de regressão. Uma regressão só pode ser feita se existe uma clara definição da relação entre uma variável dependente (Y) e uma variável independente (X), como discutido no **Capítulo 7**. No caso de uma correlação, não existe este tipo de hierarquia entre as duas variáveis, sendo que qualquer uma das duas pode ser colocada na ordenada e na abscissa dos gráficos de dispersão.

Capítulo 7. REGRESSÃO NÃO LINEAR E AJUSTE DE CURVAS

“A verdadeira viagem de descoberta não consiste em procurar novas paisagens mas em ver com novos olhos”
Marcel Proust

7.1. AJUSTE DE CURVAS: PRINCÍPIO

Ciente de que há carência de disciplinas de bioestatística aplicada à Farmacologia e de que existe frequentemente algum tipo de desconforto para muitos dos nossos alunos em relação aos aspectos matemáticos e estatísticos, além do fato de haver, talvez, um possível entendimento inadequado dos conceitos estatísticos por parte de muitos pesquisadores, gostaria de mencionar aqui duas referências que foram muito importantes para mim, (Marino, 2014; Motulsky, 2014). Primeiramente, aconselho fortemente a aquisição do livro intitulado “Intuitive Biostatistics” escrito por Harvey J. Motulsky, fundador e chefe executivo da empresa GraphPad Software que produz o programa GraphPad Prism. Como o título indica, este livro escrito para o público de ciências biomédicas, e não para estatísticos, tem como meta dar informações sobre os testes disponíveis, seus usos, vantagens e desvantagens, sem entrar em detalhes sobre como realizar os cálculos, já que temos muitos programas disponíveis para esta tarefa (e.g., o próprio GraphPad Prism, claro!). O artigo do mesmo autor “Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review” (Motulsky & Ransnas, 1987) é também uma excelente referência para o entendimento da técnica de regressão não linear, no qual me baseei para este capítulo.

Queria também mencionar a disponibilidade de um vídeo da aula “Regressão não linear e análise de curva dose-efeito”, que ministrei no Curso de BIOESTATÍSTICA APLICADA, oferecido durante o congresso da SBFTE, em Águas de Lindoia (2015): <https://www.youtube.com/watch?v=S2eBSpOs3Bs&list=PLbuHRCuw7-hJeLDurhAHO7vbDVvs6Oml8&index=7>. Os slides desta aula estão também disponíveis para baixar (em pdf) no site <http://francoisnoelfarmac.wixsite.com/fnoel/slides> (vide CURSOS: SBFTE 2015 - Bioestatística aplicada).

7.2. EQUAÇÃO LINEAR E REGRESSÃO LINEAR

Uma equação é linear quando Y (variável dependente) é uma função linear dos parâmetros, e da variável independente (X), como é o caso da equação de uma reta. O princípio da regressão linear para ajustar a “melhor” curva aos dados experimentais, e assim determinar o valor dos parâmetros de interesse, é de minimizar a soma dos quadrados dos erros (SS,

equação 13), sendo que erros são aqui as distâncias verticais entre os pontos experimentais (Y_{exp}) e os pontos da reta teórica ($Y_{\text{teórico}}$).

$$SS = \text{soma} [(Y_{\text{exp}} - Y_{\text{teórico}})^2]$$

Equação 13

É desta forma que se alcança os melhores valores dos parâmetros de interesse, como coeficiente angular (a) e intersecção da reta com o eixo vertical (b), no caso de uma reta ($Y = aX + b$).

7.3. EQUAÇÃO NÃO LINEAR

Infelizmente, muitos fenômenos de interesse da farmacologia são descritos por equações não lineares. Como veremos, houve uma evolução importante na forma de analisar quantitativamente estes fenômenos.

7.3.1. **Linearização dos dados e regressão linear**

Como a regressão linear é um procedimento familiar aos cientistas, durante muito tempo realizou-se ajuste de dados a equações não lineares de forma indireta, em duas etapas:

1. Transformando os dados de tal forma que a variável dependente Y fosse relacionada à variável independente X através de uma equação linear. Assim, se popularizaram representações gráficas tais como “gráfico dos inversos” (Lineweaver & Burke, 1934) para cinética enzimática clássica (Michaelis-Menten); gráfico de Log Concentração plasmática (C_p) vs. Tempo, para eliminação de fármacos (Farmacocinética) e Scatchard, para ensaios de *binding* de saturação.
2. Em seguida, estes dados transformados eram analisados por regressão linear.

Esta metodologia tinha a vantagem de ser de simples entendimento e de não precisar de análise computacional sofisticada, tendo sido feita inicialmente através de simples cálculo com ou sem auxílio de pequenas calculadoras de mesa. Porém, esta forma de análise tem um viés estatístico já que a transformação linear dos dados distorce os erros experimentais, o que é particularmente grave no caso do gráfico de Scatchard (Motulsky & Ransnas, 1987).

7.3.2. **Regressão não linear**

A regressão não linear é uma forma de análise para ajustar dados a qualquer equação não linear. De novo, a melhor solução é encontrada quando a soma dos quadrados dos erros é minimizada. Porém, neste caso, não existe solução matemática simples como na regressão linear, o que exige o uso de algum método iterativo, baseado em aproximações sucessivas, somente possível com o auxílio de computador e programa específico. É importante estar

ciente de que os resultados podem variar não somente em função da metodologia usada no programa como também das escolhas oferecidas dentro de um determinado programa, lembrando que a aceitação das condições padrões (*default*) é também uma escolha do pesquisador (Motulsky & Ransnas, 1987).

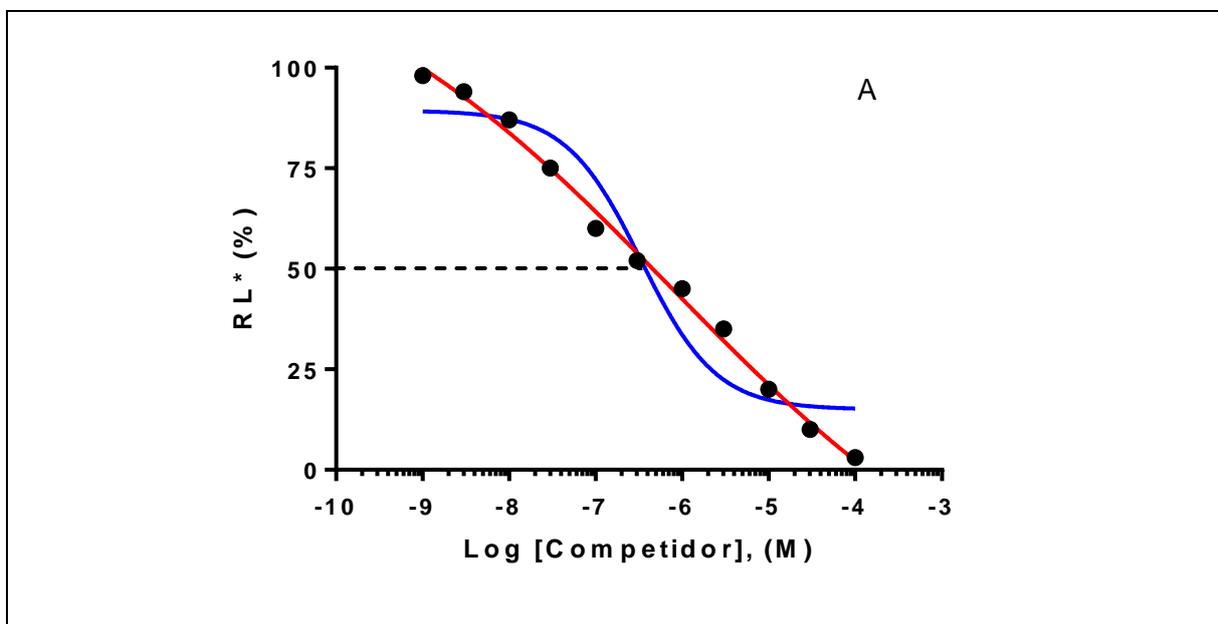
7.3.2.1. Regras de boas práticas para ajuste de curvas concentração-efeito

1. Todas as regiões da função devem ser definidas com dados reais, de tal forma que a faixa de concentração usada deve ser suficientemente abrangente para incluir o parâmetro mediano (*e.g.*, CE_{50} , CI_{50}) para evitar extrapolação.
2. Em casos normais, a razão entre as concentrações necessárias para produzir 90 e 10% do E_{max} é em torno de 100 (ou seja, duas unidades logarítmicas).
3. É recomendável que o espaçamento dos intervalos de concentração seja igual em escala logarítmica (*e.g.*, 1, 3, 10 μM , etc.) e não aritmética (1, 5, 10 μM , etc.).
4. Deve haver pelo menos três concentrações para cada parâmetro, sendo o ideal seis ou mais concentrações para a equação simples, ou seja contendo apenas os parâmetros CE_{50} e E_{max} (Equação 1A, [Figura 1](#)).
5. É melhor ter mais pontos em diferentes valores de x (concentração) do que muitas repetições de poucos valores de x ; isso leva a uma maior precisão na estimativa dos parâmetros.
6. Se o intervalo completo de concentrações não foi devidamente testado e/ou os dados experimentais forem irregulares, levando a um ajuste ruim, a parte superior e/ou inferior do ajuste pode ser errônea. Neste caso, pode ser interessante fixar os valores máximos e/ou mínimos, particularmente se soubermos que há base teórica para isso (por exemplo, fixar em 100% a inibição máxima, numa curva concentração-efeito de um inibidor enzimático, ou numa curva de *binding* de competição) ou se várias substâncias parecem ter o mesmo efeito máximo (vide exemplos nas Figuras 41 e 42).
7. Escolha do modelo (equação): os modelos simples (ou seja, com menos parâmetros, como a equação 1A - [Figura 1](#)) são mais robustos e devem ser usados, a não ser que o ajuste não seja satisfatório. Neste caso, devemos empregar modelos mais complexos, que fornecem um melhor ajuste (Vide equação 9, na [Dica 4](#)), conforme exemplificado nas Figuras 41 e 42.

7.3.2.2. Qualidade do ajuste

Outro aspecto importante a ressaltar é a necessidade de se avaliar a qualidade do ajuste para evitar que se tirem conclusões precipitadas, baseadas em parâmetros nada confiáveis. Para tanto, indico a seguir quatro formas práticas que deveriam ser usadas rotineiramente, em conjunto, como ilustrado no exemplo teórico das Figuras 41 e 42:

1. **Aspecto visual:** apesar de subjetivo, esta avaliação não deveria ser subestimada. No caso do exemplo da Figura 41A, fica claro que a curva vermelha ajusta-se melhor aos dados do que a curva azul.
2. **Gráfico dos resíduos e “Run test”:** de forma simplificada, podemos dizer que este teste verifica se existe um número excessivo de agrupamentos de pontos (*clusters*) acima e abaixo do valor teórico (diferença entre Y_{exp} e $Y_{\text{teórico}} = 0$). Este gráfico e sua análise estatística estão disponíveis no programa GraphPad Prism, sendo suficiente uma simples marcação na opção “*diagnostics*”.
3. **Precisão do valor dos parâmetros:** é imprescindível prestar atenção, e relatar, a precisão dos parâmetros, pois se o valor for muito impreciso deve-se suspeitar a escolha de opções não adequadas ou não ótimas (vide comparação entre as Figuras 41 e 42) e não se pode simplesmente considerar o valor do parâmetro, sem as devidas reservas. A Figura 41 é um bom exemplo já que apesar do ajuste visual ser satisfatório para a curva vermelha, a grande imprecisão do valor de Cl_{50} indica que algo está errado (vide comentários na legenda da Figura 41 e nova análise na Figura 42).
4. **R^2 : coeficiente de determinação:** é a fração da variância (0-1) que é “explicada” pelo modelo; este valor deve ser próximo de 1.



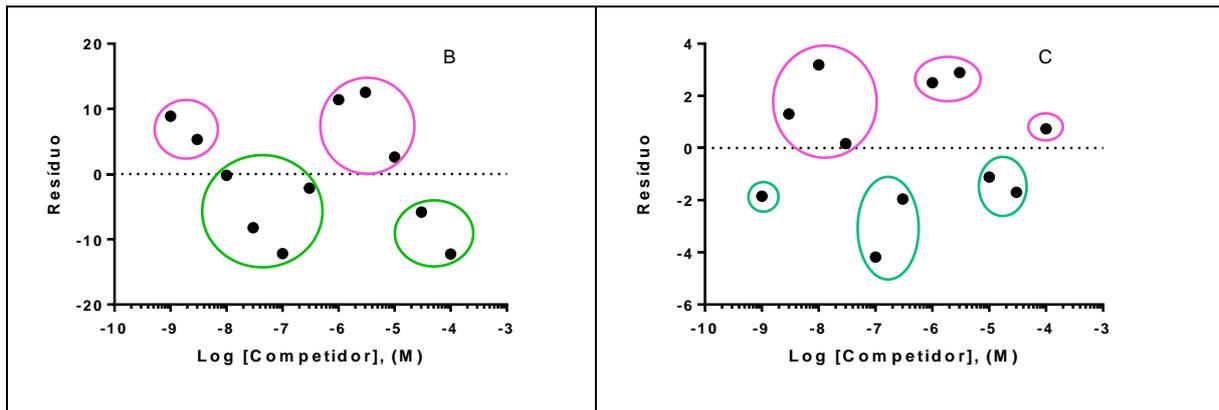


Figura 41. Análise de curva de competição atípica. A. Os dados teóricos foram analisados por regressão não linear (GraphPad Prism 6.01) comparando dois modelos: o modelo simples (curva azul, vide [Equação 7](#)) e o modelo de Hill (curva vermelha, vide Capítulo 5.2.2.2.), sem fixar os valores de “Topo” e “Base” (*Top* e *Bottom*, respectivamente). Como indicado pela análise visual, o ajuste é melhor usando-se o modelo de Hill, o que é confirmado ($p < 0,0001$) pelo teste F (*Extra sum-of-squares F test*), próprio para comparação entre modelos (Motulsky & Ransnas, 1987). Nota-se que o valor do CI_{50} ($0,75 \mu\text{M}$) é muito impreciso ($IC_{95\%}$: $0,059 - 9,6 \mu\text{M}$). Outrossim, o valor da “Base” é inferior a zero ($Bottom = -45,6 \pm 41,0$) e o valor do “Topo” é bem superior a 100% ($Top = 136 \pm 30$). O coeficiente de Hill foi bem inferior a 1 ($n_H = -0,210 \pm 0,092$). Neste caso, a análise dos gráficos dos resíduos para o modelo simples (B) e de Hill (C) pelo “*run test*” não denotou desvio significativo destes dois modelos ($p > 0,05$) apesar dos outros três critérios evidenciarem claramente que um modelo (Hill) é melhor do que o outro.

Como vimos pela análise dos parâmetros obtidos, nenhuma das duas soluções deve ser considerada satisfatória, apesar da curva em vermelha (modelo de Hill) se ajustar bem aos pontos experimentais. Neste caso, devemos rejeitar esta solução porque ela prevê valores de “Topo” e “Base” muito além dos valores que fariam sentido farmacologicamente, além de fornecer um valor de CI_{50} excessivamente impreciso.

Assim, os mesmos dados foram em seguida analisados usando-se a prerrogativa de fixar os parâmetros “Topo” e “Base” aos valores esperados do ponto de vista farmacológico para ensaios de competição, ou seja: 100% (Topo) e 0% (Base). Desta vez, a precisão do parâmetro de interesse (CI_{50}) é muito boa ($IC_{95\%}$: $0,30 - 0,64 \mu\text{M}$) para o modelo de Hill. De novo, o modelo de Hill foi considerado melhor do que o modelo simples baseado na análise visual, no teste F para comparação de modelos e nos gráficos dos resíduos (Fig. 42). De fato, uma análise detalhada através do “*run test*” nos indica que o modelo simples deve ser rejeitado, pois o número de agrupamentos (2) é menor do que esperado para 11 dados experimentais, o que indica um desvio significativo (não aleatório) do modelo ($p \ll 0,05$). Por outro lado, não há desvio do modelo de Hill ($p \gg 0,05$).

Porém, devemos ficar atentos ao fato que um modelo ser melhor do que o outro não significa que ele seja ideal, como exemplificado a seguir. De fato, como explicado na [Figura 21](#) (Capítulo 5.2.2.2.) para estes mesmos dados, os valores experimentais de ligação são ainda melhor ajustados quando se usa o modelo de dois sítios de ligação, obtendo-se os

seguintes parâmetros: 50% de sítios de alta afinidade ($CI_{50} = 30 \text{ nM}$) e 50% de sítios de baixa afinidade ($CI_{50} = 7 \text{ }\mu\text{M}$).

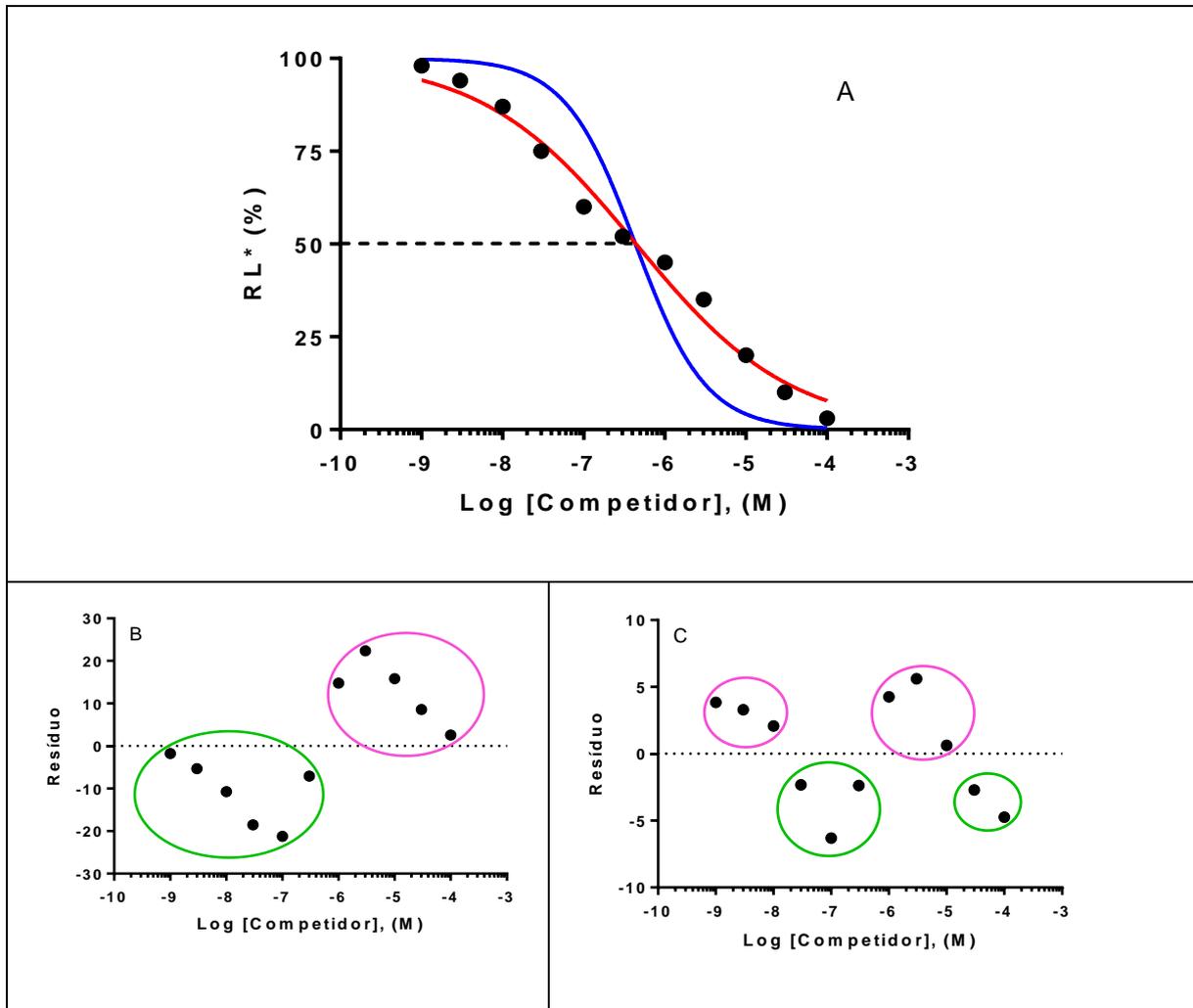


Figura 42. Análise de curva de competição atípica. A. Os dados da [Figura 41](#) foram analisados por regressão não linear (GraphPad Prism 6.01) comparando os mesmos dois modelos (o modelo simples: curva azul, [Equação 7](#); e o modelo de Hill: curva vermelha), porém desta vez fixando os valores de “Topo” em 100% e de “Base” em 0%. Como indicado pela análise visual (A), o ajuste é melhor usando-se o modelo de Hill, o que é confirmado pelo teste F ($p < 0,0001$) e pela análise dos gráficos dos resíduos para o modelo simples (B) e de Hill (C). De fato, em B há somente dois grupos de pontos (“run”) o que é pouco para 11 pontos experimentais e uma equação com somente dois parâmetros, como indica o “run test” que denota um desvio significativo do modelo simples ($p = 0,0043$), que deve ser rejeitado, o que não ocorre com o modelo de Hill ($p = 0,11$). Parâmetros para o modelo de Hill: $CI_{50} = 0,44 \text{ }\mu\text{M}$ ($IC_{95\%}$: $0,30 - 0,64 \text{ }\mu\text{M}$) e coeficiente de Hill (n_H) = $-0,457 \pm 0,033$.

Capítulo 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA E APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS

“Eu sei que nada sei”

Socrátes

Em função dos problemas de estatística apontados na literatura, os quais poderiam parcialmente explicar a falta de reprodutibilidade de dados publicados (Ioannidis, 2005; Marino, 2014), várias revistas científicas emitiram novos *guidelines* para o tratamento estatístico dos dados, na área biomédica. A revista *Biochemical Pharmacology*, por exemplo, menciona claramente que *“se espera que todos os achados tenham sido submetidos a análises quantitativas rigorosas, com cálculo e relato dos valores de CI_{50} , K_i , CE_{50} , etc. Estes devem ser derivados a partir de um mínimo de três experimentos separados (se houver repetição dentro de um experimento, como o uso de triplicata, deve-se usar a média para obter um único valor em cada experimento)”*.

O que nem sempre é apreciada, é a necessidade de se distinguir os testes a serem aplicados aos dois tipos de parâmetros que caracterizam as curvas concentração-efeito, nas suas diversas modalidades (vide ensaios diretos e indiretos, Capítulos 4 e 5): o parâmetro que defina o efeito máximo (E_{max} , B_{max} , etc) e o parâmetro que defina a afinidade/potência (CI_{50} , K_i , CE_{50}).

8.1. E_{max} , B_{max}

O caso deste parâmetro é mais simples, pois sua distribuição, numa população, obedece a uma distribuição normal, Gaussiana. Assim sendo, recomenda-se apresentar os resultados como média aritmética de n experimentos com seu erro padrão (erro padrão da média, E.P.M.), como exemplificado na tabela 1.

Neste caso, os testes estatísticos usados para determinar a significância das diferenças entre grupos (por exemplo, controle e tratados) devem ser realizados considerando a média aritmética dos parâmetros, geralmente usando teste t de Student para comparação entre dois grupos e teste ANOVA seguido de teste para comparações múltiplas nos casos de haver mais de dois grupos a serem comparados.

8.2. CE_{50} , CI_{50} , K_i

O caso deste parâmetro é mais complicado, pois ele obedece a uma distribuição log-normal (Kenakin, 2009). Assim sendo, podemos escolher entre as seguintes opções para expressar as médias deste parâmetro:

1. Apresentar os resultados como médias aritméticas dos valores transformados em logaritmos \pm E.P.M. Nota-se que é mais comum, em farmacologia, usar os valores de “ $-\log$ ” para evitar sinal de menos. Assim, no caso de K_i , por exemplo, usa-se os valores de pK_i ($-\log K_i$).
2. Alternativamente, pode-se expressar os resultados como médias geométricas com seus intervalos de confiança a 95%, como exemplificado na tabela 1. Apesar de esta alternativa ser menos usada em farmacologia, ela é considerada como mais adequada por diferentes autores para reportar a precisão com a qual a média de uma amostra foi caracterizada (Kenakin, 2009; Drummond & Tom, 2012).

Tabela 1. Parâmetros de ligação de [3 H]-8-OH-DPAT e [3 H]-p-MPPF em preparações de membrana de hipocampo de rato. Os resultados de quatro experimentos independentes são expressos como médias geométricas e intervalos de confiança de 95% (IC) para K_d e como médias aritméticas \pm E.P.M. para valores de B_{max} . Adaptado de Noël e cols., 2014.

Ligante	K_d (95% IC) (nM)	B_{max} (fmoles/mg proteína)
[3 H]-8-OH-DPAT	0,68 (0,47 – 0,98)	114 \pm 11
[3 H]-p-MPPF	0,74 (0,40 – 1,4)	119 \pm 16

No caso deste parâmetro de potência/afinidade, os testes estatísticos paramétricos usados para determinar a significância das diferenças entre grupos (por exemplo, controle e tratados) devem ser realizados considerando as médias geométricas (médias dos valores transformados em logaritmos, como pK_i , por exemplo).



Dica 12. Precisão de parâmetros. É importante não confundir a precisão de um parâmetro que corresponde à estimativa do erro oriundo do ajuste de uma curva durante o processo de regressão não linear, informado pelo programa GraphPad Prism, por exemplo, (vide [Capítulo 7](#)), com a estimativa da variabilidade biológica. A magnitude do erro de ajuste (“*goodness of fit*”) depende do modelo e dos dados enquanto a estimativa do erro biológico é adquirida somente com a repetição do experimento. Assim sendo, não seria correto usar o “erro padrão” do parâmetro obtido pelo ajuste de uma curva (mesmo que seja uma curva média de n experimentos) em teste de comparação de médias, como o teste t de Student por exemplo. O correto é fazer um teste utilizando-se a média dos valores individuais dos parâmetros obtidos pelo ajuste de n curvas independentes, como apresentado na Tabela 1.

Capítulo 9. PORTFÓLIO DE ENSAIOS DO LFBM

“O sucesso é a capacidade de ir de uma falha a outra sem perda de entusiasmo”

Winston Churchill

9.1. INTRODUÇÃO

Ciente da necessidade de desenvolver *know-how* em planejamento e desenvolvimento de novos fármacos no país, começamos em 1997 uma colaboração interdisciplinar, inicialmente com químicos do próprio CCS-UFRJ (LASSBio/Faculdade de Farmácia; LQB/NPPN), visando o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Tendo tradição no uso da técnica de *binding* para estudar a interação fármaco-receptor, nosso laboratório, para compensar a baixa vazão (velocidade), optou por desenvolver ensaios com desenho cuidadoso e maior grau de desempenho (maior probabilidade de descobrir uma atividade biológica). Nosso objetivo foi também disponibilizar uma opção de serviço no país, sem necessidade de excessiva burocracia e com possibilidade de discutir protocolos e resultados de forma personalizada.

Ao consolidar minha participação em projetos interdisciplinares de desenvolvimento acadêmico de fármacos, iniciado no PRONEX de 1997 (*Desenvolvimento de Fármacos: Química, Farmacologia e Toxicologia*) e depois nos Instituto do Milênio (*Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos - 2005*) e INCTs (*INCT de Fármacos e Medicamentos - INOFAR, 2008 e 2014*), fui estimulado cada vez mais a oferecer novos ensaios de *binding* e também a apresentá-los na forma de portfólio.

O portfólio apresentado a seguir oferece ensaios clássicos de competição, assim como ensaios de “*binding* funcional”, que permitem determinar a atividade intrínseca de forma semiquantitativa (*um composto é agonista, antagonista ou agonista inverso?*), e.g., para receptores metabotrópicos. Temos também condições de elaborar ensaios cinéticos de *binding* para verificar a hipótese de efeito alostérico (Pôças e cols., 2003) ou para estimar o tempo de residência no receptor (“*drug-target residence time*”) (Pompeu e cols., 2015).

Recentemente, incluímos um primeiro ensaio para avaliar inibidores de sistemas de captação (*uptake*), em função de um projeto de desenvolvimento de fármacos visando este tipo de alvo.

Por outro lado, ensaios funcionais mais clássicos, onde medimos a resposta biológica em modelo de tecido/órgão isolado, nos permitem avaliar a eficácia de uma nova substância através da resposta máxima que ele é capaz de produzir ($E_{máx}$) assim como sua potência, estimada a partir da concentração necessária para produzir metade desta resposta máxima (CE_{50}).

9.2. ACESSIBILIDADE

O arquivo em pdf deste portfólio pode ser baixado no site:

<http://francoisnoelfarmac.wixsite.com/fnoel/laboratorio> (aba “Laboratório”: vide “portfolio de ensaios” no final da página).

9.3. CATÁLOGO DE ENSAIOS E EXEMPLO

Reproduzo abaixo a lista dos ensaios de *binding* que já foram validados no laboratório ao longo dos anos, sendo que alguns são usados de rotina enquanto outros não são disponíveis imediatamente por depender de compra de nova alíquota de radioligante.

Receptores – *binding* (R) / *binding funcional* (RF*)

RF binding funcional*: ensaio que permite determinar a atividade intrínseca de forma qualitativa (um composto é agonista, antagonista ou agonista inverso?) – *vide detalhes abaixo*.

Adenosina (A_{2A} – agonista): [3H]-CGS 21680	R1
Adenosina (A_{2A} – antagonista): [3H]-ZM 241385	R2
<i>[3H]-ZM 241385 (Na^+-shift)</i>	R2F*
Adrenérgico (α_{1B}): [3H]-prazosina	R3
Adrenérgico (α_{2A}) [3H]-RX 821002	R4
<i>[3H]-RX 821002 (GTP-shift)</i>	R4F*
Benzodiazepina (central): [3H]-Flunitrazepam	R5
<i>[3H]-Flunitrazepam (GABA-shift)</i>	R5F*
Benzodiazepina (periférico): [3H]-PK11195	R6
Canal de cálcio voltagem-dependente (tipo L): [3H]-PN200-110	R7
Canal de cálcio sensível à rianodina: [3H]-Rianodina	R8
Dopamina (D_1): [3H]- SCH 23390	R9
Dopamina (D_2 -like): [3H]-YM-09151-2	R10
Dopamina (D_3): [3H]-YM-09151-2 / células transfectadas	R11
Dopamina (D_4): [3H]-YM-09151-2 / células transfectadas	R12
<i>[3H]-YM-09151-2 (GTP-shift)</i>	R12F*

Glutamato (tipo cainato): [³ H]-KA	R13
Glutamato (tipo AMPA): [³ H]-AMPA	R14
Glutamato (tipo NMDA): [³ H]-MK-801	R15
Muscarínico (não seletivo/M1): [³ H]-QNB	R16
Serotonina (5-HT _{1A} - Agonista): [³ H]-8OH-DPAT	R17
Serotonina (5-HT _{1A} - Antagonista): [³ H]-pMPPF	R18
<i>[³H]-pMPPF (GTP-shift)</i>	R18F*
Serotonina (5-HT _{2A}): [³ H]-cetanserina	R19
<i>[³H]-cetanserina (GTP-shift)</i>	R19F*
Serotonina (5-HT _{2C} - Antagonista): [³ H]-Mesulergina / células transfectadas	R20
Serotonina (5-HT ₇ - Antagonista): [³ H]-SB269970 / células transfectadas	R21

Como exemplo de apresentação dos ensaios, reproduzo a seguir a página do portfólio correspondendo ao *binding* para o receptor A_{2A}, na opção de ligante antagonista.

Adenosina (A_{2A} – antagonista): [³H]-ZM241385

Número de catálogo: R2

Tecido: Estriado de rato 150 mg (sinaptossomas):

Ligante: [³H]-ZM241385 (0,5 nM), antagonista seletivo - 25 °C

$B_{max} = 865 \pm 23 \text{ fmol/mg proteína}$ $Kd = 1,38 \pm 0,3 \text{ nM}$ (n=1)

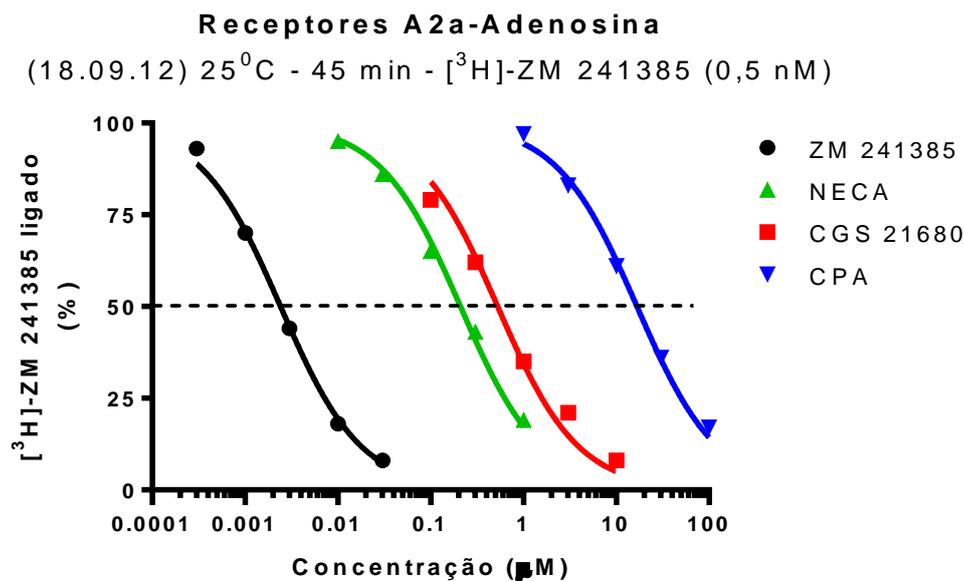
Cálculo do K_i = CI₅₀ / 1,36 (nM)

Não-específico: NECA 30 mM

Controle positivo: CGS 21680 (agonista A_{2a}; CI₅₀ A_{2a} = 0,3 - 4,3 mM); NECA (agonista A_{1a} e A_{2a}; CI₅₀ A_{2a} = 0,35 mM); CPA (agonista seletivo A_{1a}; Kd rec. A_{1a} = 0,5 nM; rec. A_{2a} = 0,79 - > 100 mM); ZM 241385 (0,29 nM);

Referência: Alexander & Millns, *Eur. J. Pharmacol.* 411: 205–210, 2001; Uustare et al. *Life Sci.* 76: 1513-1526, 2005

Artigos do Laboratório descrevendo o uso deste binding: *J. Pharmacol. Toxicol. Method*, 84:51-56, 2016.



Relevância:

Agonistas: efeitos antiinflamatória de interesse para o tratamento de doenças pulmonares (asma/DPOC), hipotensora de interesse para o tratamento da hipertensão, inotrópico positivo de interesse para o tratamento da insuficiência cardíaca, inibitório de comportamentos compulsivos de interesse potencial para tratamento de dependência química e de efeito analgésico de interesse para o tratamento da dor neuropática.

Antagonistas: bloqueiam a neurodegeneração ? (Parkinson, Alzheimer)

Capítulo 10. REFERÊNCIAS

“A vida é como uma bicicleta, você tem que seguir em frente para não perder o equilíbrio”

Albert Einstein

- Andrade E.L., Bento A.F., Cavalli J., Oliveira S.K., Freitas C.S., Marcon R., Schwanke R.C., Siqueira J.M., Calixto J.B. Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49:e5644, 2016.
- Assie 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.
- Barreiro E.J., Fraga C.A.M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, Art Med, Porto Alegre, 2ª Edição, 2008.
- Bennett J.P. Methods in binding studies, em: Neurotransmitter receptor binding, 57-71, 1978.
- Bigott-Hennkens H.M., Dannoon S., Lewis M.R., Jurisson S.S. In vitro receptor binding assay: general methods and considerations. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 52:245-253, 2008.
- Black J. Reflections on drug research. *Br. J. Pharmacol.* 161:1204-1216, 2010.
- Black J.W., Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 220:141-146, 1983.
- Borea P.A., Dalpiaz A., Varani K., Gilli P, Gilli G. Can thermodynamic measurements of receptor binding yield information on drug affinity and efficacy? *Biochem. Pharmacol.* 60:1549-1556, 2000.
- Borea P.A., Dalpiaz A., Varani K., Guerra L, Gilli G. Binding thermodynamics of adenosine A_{2a} receptor ligands. *Biochem. Pharmacol.* 49:461-469, 1995.
- Bowes J., Brown A.J., Hamon J., Jarolimek W., Sridhar A., Waldron G., et al. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11:909-922, 2012.
- Braga R.C., Alves V.M., Silva A.C., Nascimento M.N., Silva F.C., Liao L.M., Andrade C.H. Virtual screening strategies in medicinal chemistry: the state of the art and current challenges. *Curr. Top. Med. Chem.* 14:1899-912, 2014.
- Braestrup C., Honor T., Nielse M., Peterse E.N., Jense L.H. Ligands for benzodiazepine receptors with positive and negative efficacy. *Biochem. Pharmacol.* 33:859-862, 1984.

- Bylund D.B., Toews M.L. Quantitative versus qualitative data: the numerical dimensions of drug action. *Biochem. Pharmacol.* 87:25-39, 2014.
- Changeux J.P., Edelstein S. Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 Biol. Rep.* 3:19, 2011.
- Clark A.J. The mode of action of drugs on cells, London, Edward Arnold & Co., 1933.
- Colquhoun D. The quantitative analysis of drug-receptor interactions: a short history. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:149-157, 2006.
- Copeland R.A. The drug–target residence time model: a 10-year retrospective. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15:87-95, 2016.
- Copeland R.A., Pompliano D.L., Meek T.D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:730-739, 2006.
- Cumming J.G., Raymond M., Finlay V., Giordanetto F., Hemmerling M., Lister T., Sanganee H., Waring M. Potential strategies for increasing drug-discovery productivity. *Future Med. Chem.* 6:515-527, 2014.
- De Jong L.A.A., Ugesa D.R.A., Frank J.P., Bischoff R. Receptor–ligand binding assays: Technologies and Applications. *J. Chromatogr. B.* 829:1-25, 2005.
- De Lean A., Stadel J.M., Lefkowitz R.J. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255:7108-7117, 1980.
- de Meyts P., Roth J., Neville D.M. Jr., Gavin J.R. 3rd, Lesniak M.A. Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55:154-161, 1973.
- Devillers-Thiery A., Giraudat J., Bentaboulet M., Changeux J.P. Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2067-2071, 1983.
- Drummond G.B., Tom B.D. Presenting data: can you follow a recipe? *Brit. J. Pharmacol.* 165:777-781, 2012.
- Ehrlich P. Croonian lecture: on immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. Lond.* 66:424-448, 1899.
- Ehrlich P. Address in Pathology, on Chemiotherapy: delivered before the seventeenth international congress of medicine. *Br. Med. J.* 2:353-359, 1913.

- Fang Y. Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 7:969-988, 2012.
- Freire E. A. Thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. *Chem. Biol. Drug Des.* 74:468-472, 2009.
- Gessi S., Fogli E., Sacchetto V., Varani K., Merighi S., Leung E., Lennan S.M., Borea P.A. Thermodynamics of A_{2B} adenosine receptor binding discriminates agonistic from antagonistic behavior. *Biochem. Pharmacol.* 75:562-569, 2008.
- Guo D., Mulder-Krieger T., Ijzerman A.P., Heitman L.H. Functional efficacy of adenosine A_{2A} receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br. J. Pharmacol.* 166:1846-1859, 2012.
- Guo D., Hillger J.M., Ijzerman A.P., Heitman L.H. Drug-Target Residence Time—A case for G Protein-Coupled Receptors. *Med. Res. Rev.* 34:856-892, 2014.
- Guo D., Van Dorp E.J.H., Mulder-Krieger T., Van Veldhoven J.P.D., Brussee J., Ijzerman A.P., Heitman L.H. Dual-Point Competition Association Assay: A Fast and High-Throughput Kinetic Triagem Method for Assessing Ligand-Receptor Binding Kinetics. *J. Biomol. Scre.* 18:309-20, 2013.
- Hall M.D., El Mestikawy S., Emerit M.B., Pichat L., Hamon M., Gozlan H. [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *J. Neurochem.* 44:1685-1696, 1985.
- Hill A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. Suppl.* 40:iv-vii, 1910.
- Jiang M., Spicher K., Boulay G., Wang Y., Birnbaumer L. Most central nervous system D₂ dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:3577-3582, 2001.
- Ioannidis J.P. Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2:e124, 2005.
- Kapur S., Seeman P. Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D₂ receptors. Implications for atypical antipsychotic action. *J. Psychiatry Neurosci.* 5:161-166, 2000.
- Kenakin T.A. Pharmacological Assay Formats: Binding. *Em T.A. Kenakin (Ed.), A pharmacology primer: theory, applications, and methods (pp. 61-79).* London, UK: Elsevier Academic Press, 3^a edição, 2009.
- Kenakin T. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. *Br. J. Pharmacol.* 168:554-575, 2013.

- Kenakin T., Miller L.J. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 62:265-304, 2010.
- Koshland D.E.Jr., Némethy G., Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365-385, 1966.
- Lefkowitz R.J., Caron M.G., Michel T., Stadel J.M. Mechanisms of hormone-effector coupling: The B-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Federation Proc.* 41:2664-2670, 1982.
- Lefkowitz R.J., Limbird L.E., Mukherjee C., Caron M.G. The beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 457:1-39, 1976.
- Lineweaver H., Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56:658-666, 1934.
- Litschig S., Gasparini F., Rueegg D., Stoehr N., Flor P.J., Vranesic I., Prézeau L., Pin J.P., Thomsen C., Kuhn R. CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol. Pharmacol.* 55:453-461, 1999.
- Lopes D.V.S., Caruso R.R.B., Castro N.G., Costa P.R.R., da Silva A.J.M., Noël, F. Characterization of a new synthetic isoflavonoid with inverse agonist activity at the central benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 495:87-96, 2004.
- Lopez L.B., Quintas L.E.M., Noël F. Influence of development on Na/K-ATPase expression: isoform and tissue dependency. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 131/2:323-333, 2002.
- Lu J.J., Pan W., Hu Y.J., Wang Y.T. Multi-target drugs: the trend of drug research and development. *PLoS One* 7:e40262, 2012.
- Luthi U., Waser P.G. Autoradiography of end-plates with carbon-14-calabash-curarine I and carbon-14-decamethonium. *Nature* 178:981, 1956.
- Marino M.J. The use and misuse of statistical methodologies in pharmacology research. *Biochem. Pharmacol.* 87:78-92, 2014.
- May L.T., Avlani V.A., Sexton P.M., Christopoulos A. Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors. *Curr. Pharm. Design* 10:2003-2013, 2004.
- Milligan G. Principles: Extending the utility of [35S]GTPγS binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* 24:87-90, 2003.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118, 1965.

- Motulsky H.J. Common Misconceptions about data analysis and statistics. *Pharma. Res. Per.* 3:e00093, 2014.
- Motulsky H.J. Intuitive Biostatistics (A nonmathematical guide to statistical thinking). Oxford University Press, 3^a edição, 2014.
- Motulsky H.J., Mahan L.C. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the Law of Mass Action. *Mol. Pharmacol.* 25:1-9, 1983.
- Motulsky H.J., Ransnas L.A. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB J.* 1:365-374, 1987.
- Nelson D.L. Structure-activity relationships at 5-HT_{1A} receptors: binding profiles and intrinsic activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4:1041-1051, 1991.
- Neubig R.R., Spedding M., Kenakin T., Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 55:597-606, 2003.
- Noël F., Mendonça-Silva D.L., Quintas L.E.M. Radioligand binding assays in the drug discovery process: high throughput screening and the risk of false negative. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 51:169-173, 2001.
- Noël F., Mendonça-Silva D.L., Thibaut J.P.B., Lopes D.V.S. Characterization of two classes of benzodiazepine binding sites in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 134:1003-1012, 2007.
- Noel F., Monteiro do Monte F. Na⁺-shift binding assay for estimation of the intrinsic efficacy of ligands at the A_{2A} adenosine receptor. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 84:51-56, 2017.
- Noël F., Pompeu T.E., Moura B.C. Functional binding assays for estimation of the intrinsic efficacy of ligands at the 5-HT_{1A} receptor: application for screening drug candidates. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 70:12-18, 2014.
- Noël F., Quintas L.E.M., Freitas E., Caricati-Neto A., Lafayette S.S.L., Wanderley A.G., Jurkiewicz A. Quantitative analysis of the high-affinity binding sites for [³H]ouabain in the rat vas deferens and their immunological identification as the α_2 isoform of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. Pharmacol.* 55:1531-1535, 1998.
- Odagaki Y., Toyoshima R. 5-HT_{1A} receptor agonist properties of antipsychotics determined by [35S]GTP γ S binding in rat hippocampal membranes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34:462-466, 2007.

- Paton W.D., Rang H.P. The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 163:1-44, 1965.
- Pearce R.K., Seeman P., Jellinger K., Tourtellote W.W. Dopamine uptake sites and dopamine receptors in Parkinson's disease and schizophrenia. *Eur. Neurol.* 30(suppl1):9-14, 1990.
- Poças E.S.C., Costa P.R.R., Silva A.J.M., Noël F. 2-Methoxy-3,8,9-Trihydroxy Coumestan: a new synthetic inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase with an original mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* 66:2169-2176, 2003.
- Pompeu T.E.T., Monte F.M., Bosier B., Fraga C.A.M., Barreiro E.J., Menegatti R., Hermans E., Noël F. Partial agonism and fast dissociation of LASSBio-579 at dopamine D2 receptor. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 62:1-6, 2015.
- Quintas L.E.M., Caricati-Neto A., Lafayette S.S.L., Jurkiewicz A., Noël F. Down-regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α_2 isoform in denervated rat vas deferens. *Biochem. Pharmacol.* 60:741-747 2000.
- Raffa R.B., Porreca F. Thermodynamic analysis of the drug-receptor interaction. *Life Sci.* 44:245-258, 1989.
- Rang H.P. The receptor concept: pharmacology's big idea. *Br. J. Pharmacol.* 147(Suppl 1):S9–S16, 2006.
- Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R., Sanishvili R., Fischetti R.F. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450:383–387, 2007.
- Rasmussen S.G., DeVree B.T., Zou Y., Kruse A.C., Chung K.Y., Kobilka T.S., Thian F.S., Chae P.S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J.M., Shah S.T., Lyons J.A., Caffrey M., Gellman S.H., Steyaert J., Skinotis G., Weis W.I., Sunahara R.K., Kobilka B.K. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477:549-555, 2011.
- 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.
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. New York Acad. Sci.* 51:660-672, 1949.
- Souto Pardon R., Noël F. Heterogeneity of ouabain binding sites in *Schistosoma mansoni*: first evidence for the presence of two (Na⁺,K⁺)ATPase isoforms in platyhelminths. *Biochem. Pharmacol.* 47:331-336, 1994.

- Speth R.C., Wastek G.J., Yamamura H.I. Benzodiazepine receptors: temperature dependence of [3H]flunitrazepam binding. *Life Sci.* 24:351-7, 1979.
- Stephenson R. A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.* 11:379-393, 1956.
- Strange P.G. Use of the GTPγS ([35S]GTPγS and Eu-GTPγS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 161:1238-1249, 2010.
- Strasser A., Wittmann H.J. Binding of ligands to GPCRs – How valid is a thermodynamic discrimination of antagonists and agonists? : *J. Physic. Chem. Biophysic.* S1:001, 2012.
- Strasser A., Wittmann H.J., Schneider E.H., Seifert R. Modulation of GPCRs by monovalent cations and anions. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.* 388:363-380, 2015.
- Suratman S., Leach K., Sexton P., Felder C., Loiacono R., Christopoulos A. Impact of species variability and 'probe-dependence' on the detection and in vivo validation of allosteric modulation at the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *Br. J. Pharmacol.* 162:1659-1670, 2011.
- Swinney D.C., Haubrich B.A., Van Liefde I., Vauquelin G. The Role of Binding Kinetics in GPCR Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 15:1-19, 2015.
- Testa B., Jenner P., Kilpatrick G.J., El Tayar N., Van de Waterbeemd H., Marsden C.D. Do thermodynamic studies provide information on both the binding to and the activation of dopaminergic and other receptors? *Biochem. Pharmacol.* 36:4041-4046, 1987.
- Urban J.D., Clarke W.P., von Zastrow M., Nichols D.E., Kobilka B., Weinstein H., Javitch J.A., Roth B.L., Christopoulos A., Sexton P.M., Miller K.J., Spedding M., Mailman R.B. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320:1-13, 2007.
- Vauquelin G. Determination of drug–receptor residence times by radioligand binding and functional assays: experimental strategies and physiological relevance. *Med. Chem. Comm.* 3:645-651, 2012.
- Visser S.A.G., Wolters F.L.C., Gubbens-Stibbe J.M., Tukker E., Van Der Graaf P.H., Peletier L.A., Danhof M. Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effects of GABA_A receptor modulators: in vitro-in vivo correlations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308:88-101, 2003.
- Von Zastrow M. Receptores de fármacos e farmacodinâmica. *Em: Farmacologia básica e clínica.* Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. (eds.), AMGH editora Ltda., 12^a edição, 2012.
- Weiland G.A., Minneman K.P., Molinoff P.B. Fundamental difference between the molecular interactions of agonists and antagonists with the beta-adrenergic receptor. *Nature* 281:114-117, 1979.

Williams C., Sewing A. G-Protein Coupled Receptor Assays: To Measure Affinity or Efficacy that is the Question. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:285-292, 2005.

Wittmann H.J., Seifert R., Strasser A. Contribution of binding enthalpy and entropy to affinity of antagonist and agonist binding at human and guinea pig histamine H(1)-receptor. *Mol. Pharmacol.* 76:25-37, 2009.

Wooten D., Christopoulos A., Sexton P.M. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug Discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* 12:630-641, 2013.