



Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Av. Carlos Chagas Filho, 373 - Bloco J do CCS - Ilha do Fundão

RIO DE JANEIRO - RJ - CEP: 21941-912 -

FONE: +55 (21) 3938-6732

E-mail: fnoel@pharma.ufrj.br

HomePage: <http://www.icb.ufrj.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=176>

Setor de *Screening* Farmacológico

Projeto de extensão (*categoria: prestação de serviço especializado*), aprovado em reunião da congregação do ICB-UFRJ (04/02/2009).

Atualizado em Janeiro 2015

1. Apresentação
2. Equipe
3. Catálogo de ensaios
4. Manuseio das substâncias
5. Entrega dos resultados
6. Preços ou condições de colaboração
7. Instalações

1. APRESENTAÇÃO

A descoberta de novos fármacos baseia-se na avaliação da atividade biológica de novas substâncias sintéticas e de produtos naturais. Apesar do papel histórico que os bioensaios com tecidos/orgãos isolados tiveram na descoberta de novos fármacos (Blake, 2010), a partir dos anos '80 a grande indústria farmacêutica adotou os ensaios de radioligação (*binding*), baseadas na medida da ligação do composto ao receptor, para a realização do *screening* farmacológico (triagem primária de grande número de substâncias). As principais vantagens destes ensaios de radioligação são sua sensibilidade, especificidade e facilidade de uso (Hulme & Trevethick, 2010) assim como possibilidade de robotização. Com esta técnica pode-se avaliar a interação fármaco-receptor de forma direta, através de ensaio de competição onde o ligante radioativo e a substância teste competem pelo mesmo receptor, sendo possível determinar parâmetros como o CI_{50} (concentração necessária do agente competidor para inibir 50% da ligação do radioligante ao receptor) e K_i (constante de dissociação, medindo a afinidade da substância teste, não radioativa, pelo receptor). Os ensaios de *binding* são também essenciais para validar os modelos de *docking* assim como para realização de Relação Estrutura-Atividade, etapas essenciais no planejamento racional de fármacos baseado em estrutura (do receptor). Vale ressaltar que os ensaios de *binding* são também importantes para detalhar o mecanismo e a cinética de ligação dos fármacos.

Além destes ensaios clássicos, ensaios de *binding* mais sofisticados podem fornecer informações importantes quanto à atividade intrínseca de um ligante (*binding funcional*) ou um mecanismo de modulação alostérica. Neste caso, uma série de ensaios de radioligação diferentes pode ser utilizada, cada um com as suas vantagens e desvantagens (May e cols., 2004). Ademais, ensaios de cinética de competição estão sendo 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 novo fármacos (Guo e cols., 2014). De fato, existem algumas evidências de vantagens quanto à cinética rápida ou lenta de dissociação do ligante, como no caso de agonistas do receptor A_{2A} onde foi demonstrado que a eficácia funcional era correlacionada ao tempo de residência da substância no receptor, e não à sua afinidade (Guo e cols., 2012).

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 baseados em células), é importante prestar atenção

no ensinamento do “mago” Sir James Blake (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* baseados no alvo, sendo os 29% restantes através de ensaios fenotípicos (Cumming e cols., 2014). Ao longo dos últimos anos, observamos uma mudança na detecção das interações receptor-ligante, havendo tendência em trocar os métodos baseados em radioatividade por métodos de fluorescência. Apesar disso, as limitações técnicas próprias a estas novas técnicas fazem com que o ensaio clássico de radioligação continua sendo o método de escolha no *screening* de candidatos a fármacos (de Jong e cols., 2005).

Pressionada pela velocidade com a qual novas substâncias eram sintetizadas através da química combinatória, a grande indústria farmacêutica, assim como pequenas firmas especializadas como a CEREP/França, desenvolveram técnicas robotizadas para assegurar um *screening* suficientemente rápido (*High Throughput Screening*). Além de excessivamente caro para a realidade acadêmica, este tipo de *screening* simplificado apresenta 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, que seja por técnicas de modelagem molecular fundamentadas na estrutura tridimensional do receptor ou por bio-isomerismo, por exemplo (Barreiro & Fraga, 2008).

Ciente da necessidade de desenvolver *know-how* em planejamento e desenvolvimento de novos fármacos no país, iniciamos, 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 uma certa tradição no uso da técnica de *binding* para estudar a interação fármaco-receptor, nosso laboratório optou por desenvolver ensaios com desenho cuidadoso para compensar a baixa vazão (velocidade) por um maior grau de desempenho (maior probabilidade de descobrir uma atividade biológica). Nosso objetivo foi também de disponibilizar uma alternativa no país, sem necessidade de excessiva burocracia e com possibilidade de discutir protocolos e resultados de forma personalizada. O portfolio 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?*), eg 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*).

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} ou DE_{50}).

Em função deste tipo de projeto, tivemos participação no depósito de quatro patentes internacionais: “*Thienylhydrazon with digitalis-like properties (positive inotropic effects)*” (PCT/US00/17024); “*Use of Adrenergic N-Phenylpiperazine Antagonists, Pharmaceutical Compositions Containning Them, and Methods of Preparing Them*” (USPTO: 20070219213); “*N-phenylpiperazine derivatives as antagonists of $\alpha 1A$ -, $\alpha 1D$ -adrenoceptors and 5-HT1A receptors for the treatment of benign prostate hyperplasia, pharmaceutical compositions containing them*” (PCT/BR2013/00003 e US14/370,646) e “*DERIVADOS BENZILIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA*” (PCT/BR2014/000306).

Tivemos também participação em diversos depósitos de patentes nacionais (INPI) e em diferentes artigos científicos na área fronteiriça entre Química medicinal e Farmacologia (vide CV-LATTES do Coordenador, Prof. F. Noël em: <http://lattes.cnpq.br/5962306335524096>).

Esta atividade de *screening* é também inserida em projetos multidisciplinares voltados para a descoberta de novos fármacos, como o **Instituto do Milênio INOFAR** “*Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos*” (2005-2008) e o **INCT de Fármacos e Medicamentos** (INOFAR: 2008-2012), ambos sob coordenação do Professor Eliezer J. Barreiro/UFRJ.

Referências:

- Barreiro E.J. & Fraga C.A.M. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Art Med, Porto Alegre, 2008 – 2ª Edição.
- Black, J. Reflections on drug research. *Br. J. Pharmacol.* 161: 1204–1216, 2010.
- Cumming JG, Raymond M, Finlay V, Giordanetto F, Hemmerling M, Lister T, Sangane 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.
 - 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, Mulder-Krieger T, IJzerman AP, Heitman LH. Functional efficacy of adenosine A_{2A} receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br. J. Pharmacol.* 166:1846-59, 2012.
 - Hulme E.C. & Trevethick M.A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* 161: 1219-1237, 2010.
 - 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
 - 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.
 - Poças, Elisa S. C., Costa, P.R.R., Silva, A.J.M. & Noël, F. *Biochem. Pharmacol.* 66: 2169-2176, 2003.
 - Williams C. & Sewing A. G-Protein Coupled Receptor Assays: To Measure Affinity or Efficacy that is the Question. *Comb. Chem. High Throughput Screening* 8: 285-292, 2005.

2. EQUIPE

2.1. RESPONSÁVEL

O setor de *Screening* do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular esta sob a orientação e responsabilidade direta do Dr. **François Noël**, Professor Titular, Chefe do laboratório, Pesquisador 1B (CNPq), ex-Coordenador do programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do iCB-UFRJ (2009-2010) e com experiência de mais de 10 anos em projetos multidisciplinares de desenvolvimento de fármacos junto a doutores em Farmacologia, Química medicinal e Química orgânica.

2.2. DOCENTES

Dr. François Noël, responsável

Dra. Cláudia L.M. Silva, Profa. Associado, Pesquisador 2 (CNPq), com experiência em caracterização farmacológica de novos compostos candidatos à fármacos.

3. CATÁLOGO DE ENSAIOS

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

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

(N): Novo ensaio

	Código
Adenosina (A_{2A} – agonista): [3H]-CGS 21680	R1
Adenosina (A_{2A} – antagonista): [3H]-ZM 241385	R2
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): [3H]-KA	R13
Glutamato (tipo AMPA): [3H]-AMPA	R14
Glutamato (tipo NMDA): [3H]-MK-801	R15
Muscarínico (não seletivo/M1): [3H]-QNB	R16
Serotonina ($5-HT_{1A}$ - Agonista): [3H]-8OH-DPAT	R17
Serotonina ($5-HT_{1A}$ - Antagonista): [3H]-pMPPF	R18
<i>[3H]-pMPPF (GTP-shift)</i>	R18F*

Serotonina (5-HT_{2A}): [³ H]-ketanserina	R19
<i>[³H]-ketanserina (GTP-shift)</i>	<i>R19F*</i>
Serotonina (5-HT_{2C} - Antagonista): [³ H]-Mesulergina / células transfectadas	R20

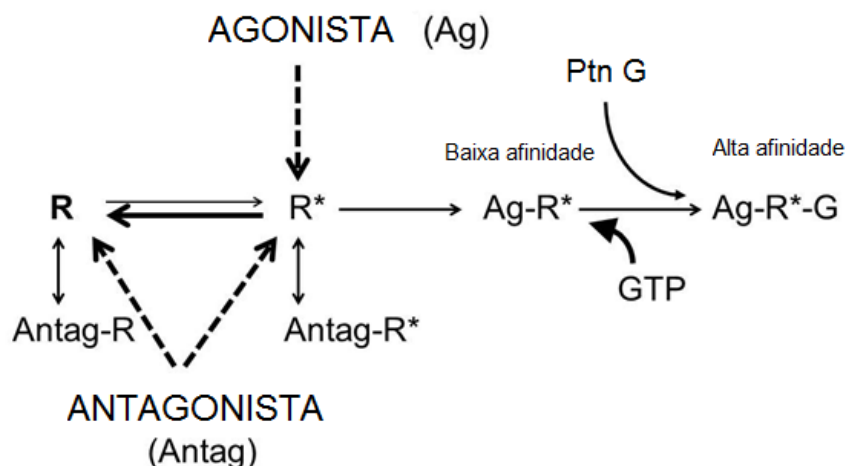
Binding funcional: princípio do ensaio de “GTP-shift”

O método do *GTP-shift* baseia-se na propriedade dos receptores metabotrópicos adotarem pelo menos duas conformações (ativa (R*) e inativa (R)) e poderem formar complexos com proteínas G (*vide esquema abaixo*).

- Substâncias agonistas induzem uma modificação conformacional do receptor, favorecendo a formação de um complexo ternário com a proteína G (Ag-R*-G), aumentando assim a afinidade pelo receptor. A presença de GTP desestabiliza o complexo ternário, diminuindo a afinidade do agonista pelo receptor, que assume a conformação Ag-R* (Kenakin, T. A. *Pharmacology Primer: Theory, Applications and Methods*. Elsevier, 3rd. ed., 2009).

- Substâncias antagonistas ligam-se ao estado inativo ou ativo do receptor com igual afinidade e não levam à formação de complexo ternário.

Sendo assim, a adição de GTP no meio de incubação dificulta a formação do complexo ternário (AR*G) e, portanto, desloca a curva de ligação de competição de agonistas, mas não antagonistas, para a direita, como resultado da menor afinidade do agonista para o receptor desacoplado (AR*) (Lefkowitz e cols., *Fed. Proc.* 41: 2664-2670, 1982).



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.*

O GTP desloca o equilíbrio para o estado de menor afinidade, sem proteína G. Já antagonistas ligam-se com igual afinidade em ambos 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., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 70:12-18, 2014).*

3.2. Enzimas – Atividade enzimática (E)

Código

ALDH (ALDH-2): Aldeído desidrogenase	E1 (N)
ATPase : Ca ²⁺ -ATPase (SERCA)	E2
ATPase : H ⁺ /K ⁺ -ATPase	E3
ATPase : Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	E4

3.4. Transportadores: captação de amino-ácidos tritiados (T)

Código

Glicina (GLYT1b humano): captação de [³ H]-glicina; células transfectadas	T1 (N)

3.4. Estudos funcionais *in vitro* (F)

Código

Aorta de rato : atividade contraturante ou relaxante	F1 (N)
---	--------

3.5. Estudos funcionais *in vivo* (V)

Código

Rato : pressão intra-uretral	V1
-------------------------------------	----

Adenosina (A_{2A} - agonista): [³H]-CGS 21680

Número de catálogo: R1

Código de preço:

Tecido: Estriado de rato 150 µg (sinaptossomas): sítio predominante de ligação do [³H]-CGS 21680 no estriado tem perfil farmacológico compatível com receptor A_{2A} (*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353: 261-271, 1996)

Ligante: [³H]-CGS 21680 (10 nM), agonista seletivo

$B_{max} = 1,07 \pm 0,09$ pmol/mg proteína

$K_d = 207 \pm 55$ nM (n=2)

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 1,05$ (nM)

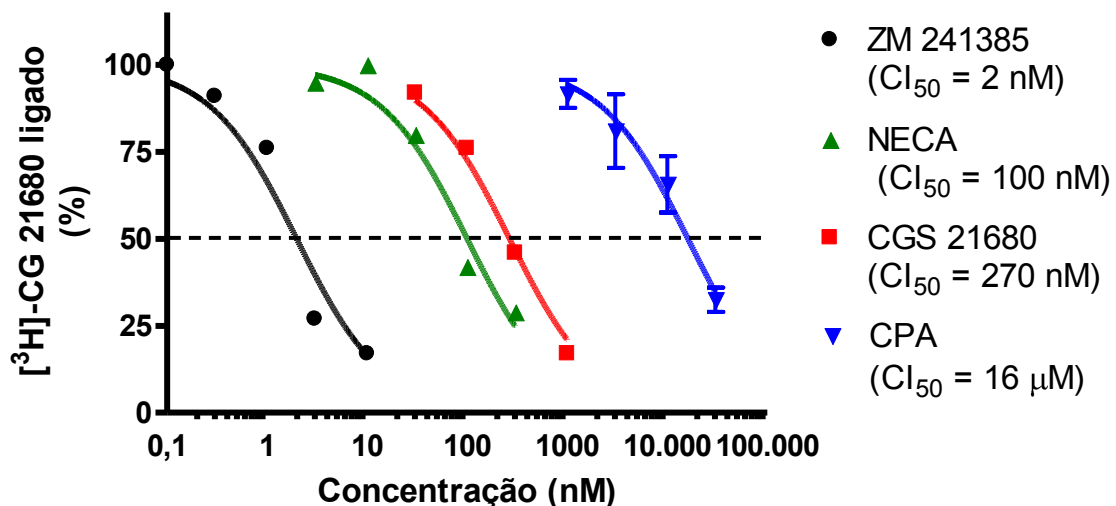
Não-específico: NECA 30 µM

Controle positivo: CGS 21680 (agonista A_{2A}; CI_{50}^* A_{2A} = 200 nM); NECA (agonista A₁ e A_{2A}; CI_{50}^* A_{2A} = 80 nM); CPA (agonista seletivo A₁; K_d^{**} rec. A₁ = 0,5 nM)

* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353: 261-271, 1996

** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 332: 179-83, 1986)

Referência: Luthin DR & Linden J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272:511-518, 1995
(temperatura = 4 °C)



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)

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

Número de catálogo: R2

Código de preço:

Tecido: Estriado de rato 150 µg (sinaptossomas):

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

$B_{max} = 865 \pm 23 \text{ fmol/mg proteina}$

$Kd = 1,38 \pm 0,3 \text{ nM } (n=1)$

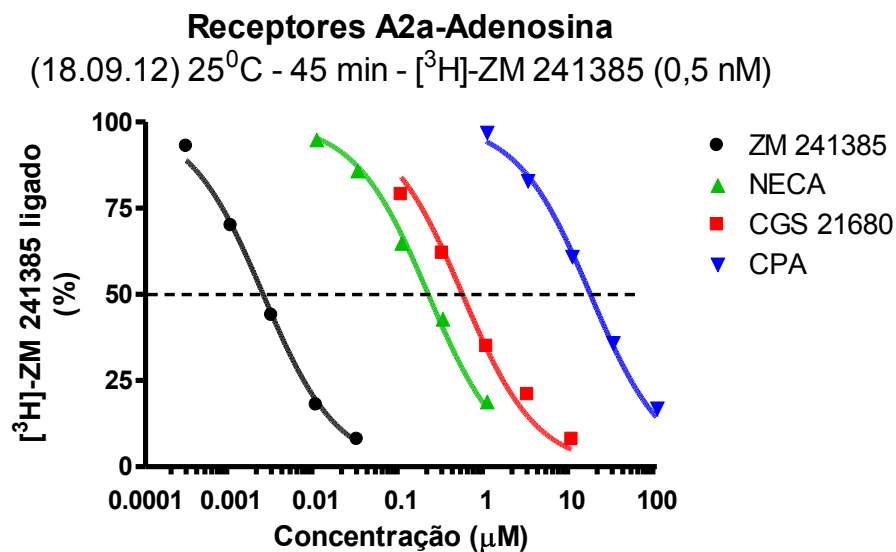
Cálculo do Ki = CI₅₀ / 1,36 (nM)

Não-específico: NECA 30 µM

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

Referência: Alexander & Millns, *Eur. J. Pharmacol.* 411: 205–210, 2001

Uustare et al. *Life Sci.* 76: 1513-1526, 2005



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)

Adrenérgico (α_{1B}): [^3H]-prazosina

Número de catálogo: R3

Código de preço:

Tecido: microsomas de fígado de rato (α_{1B})

Ligante: [^3H]-prazosina (0,1 nM), antagonista
 $B_{max} = 91,1 \pm 9,9 \text{ pmol/mg proteína}$

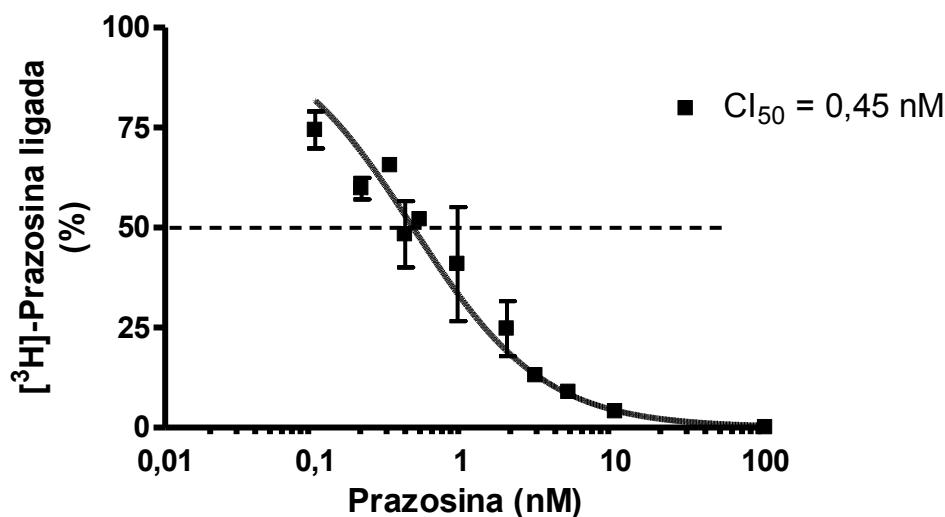
$K_d = 0,335 \pm 0,024 \text{ nM (n=3)}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 1,30 \text{ (nM)}$

Não-específico: prazosina (1 μM)

Controle positivo: prazosina (CI_{50} : 2 nM)

Referência: *Br. J. Pharmacol.* 111: 533-538, 1994; *Br. J. Pharmacol.* 116: 2591-2596, 1995 (fígado de coelho α_{1A}); *Eur. J. Pharmacol.* 342: 85-92, 1998 (fígado de rato α_{1B})



Relevância:

Antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos presentes em tecidos vasculares e não-vasculares são úteis em patologias tais como hipertensão grave (vasodilatação via receptor α_{1B} , eg. doxazosina, prazosina), em combinação com outros fármacos, e no tratamento da hiperplasia prostática benigna (relaxamento do músculo liso do colo da bexiga e da cápsula da próstata + inibição da hipertrofia, via receptor α_{1A} , eg. tansulosina).

Como há 3 subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, utilizamos diferentes preparações para poder avaliar a seletividade da molécula testada, baseado na presença majoritária de um dos subtipos nos tecidos escolhidos: fígado de rato: α_{1B} ; fígado de coelho: α_{1A} (*ensaio retirado do portfólio*).

Adrenérgico (α_{2A}): [^3H]-RX821002

Número de catálogo: R4

Código de preço:

Tecido: microsomas cérebro (cortex) de rato (tipo α_{2A})

Ligante: [^3H]-RX821002 (1 nM), agonista inverso α_{2A} (e α_{2B})

$B_{\text{max}} = 124 \pm 7 \text{ fmol/mg proteína}$

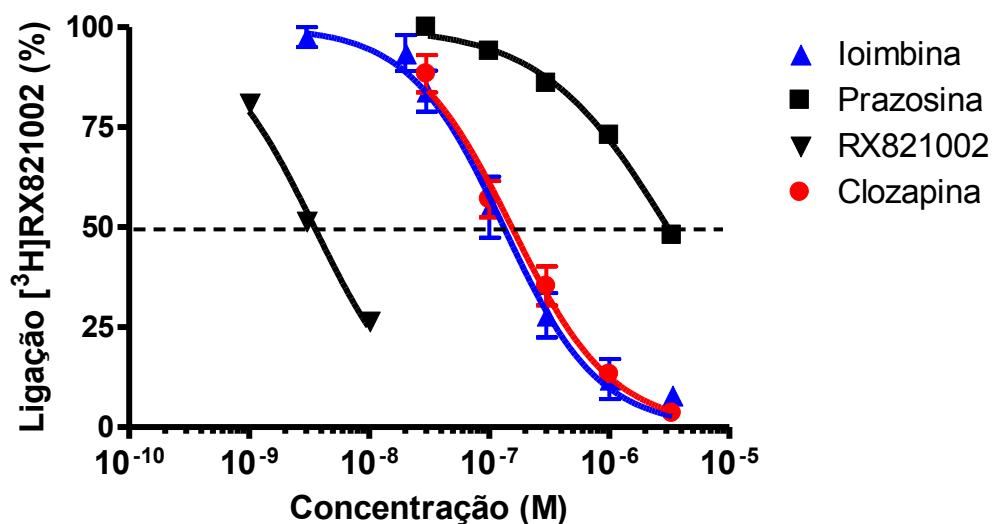
$K_d = 2,05 \pm 0,28 \text{ nM (n=1)}$

Cálculo do $K_i = \text{CI}_{50} / 1,48 \text{ (nM)}$

Não-específico: (-) adrenalina (100 μM)

Controle positivo: Ioimbina (CI_{50} : 0,15 μM); prazosina (CI_{50} : 2,6 μM)

Referência: Uhlén et al. *Pharmacol. & Toxicol.* 69: 341, 1991



Relevância:

O receptor α_{2A} é encontrado, eg, em plaquetas assim como pré-sinápticamente controlando a liberação de noradrenalina (retro-alimentação negativa).

Esquizofrenia: agonistas α_{2} -adrenérgicos poderiam aumentar a performance cognitiva dependente do córtex préfrontal, sendo considerado por alguns como de importância na busca de novo tratamento da esquizofrenia. Por outro lado, tanto a clozapina como a risperidona são potentes antagonistas dos receptores α_{2} -adrenérgicos, efeito que poderia ser importante para os seus efeitos antipsicóticos (*Molecular Psychiatry* 10: 79–104, 2005)

Dor: agonistas α_{2} -adrenérgicos (ex. dexmedetomidina) produzem sedação rápida e são usados como adjuvantes de anestésicos.

Adrenérgico (α_{2A}): [^3H]-RX821002 (GTP-shift)

Número de catálogo: R4*F

Código de preço:

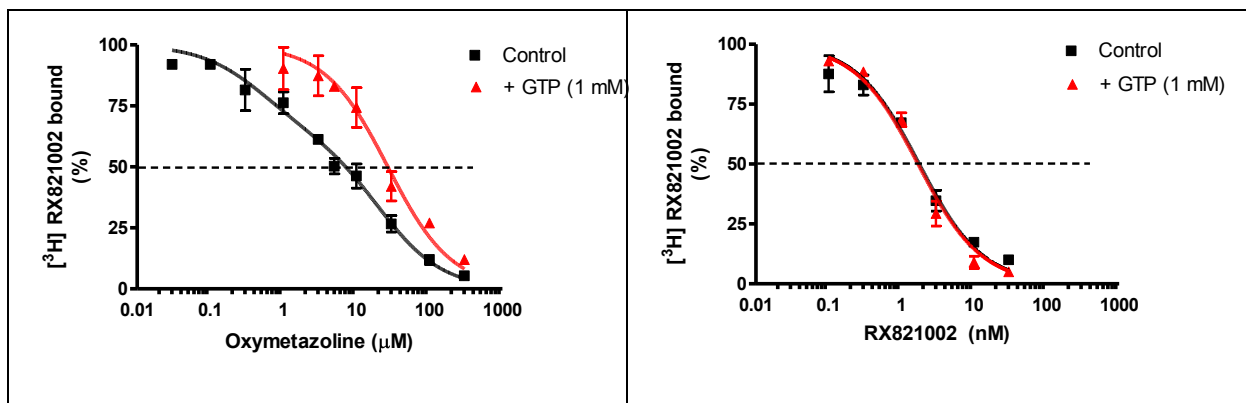
Tecido: microsomas cérebro (cortex) de rato (tipo α_{2A})

Ligante: [^3H]-RX821002 (1 nM), agonista inverso α_{2A} (e α_{2B}) na presença e ausência de GTP em largo excesso (1 mM)

Não-específico: (-) adrenalina (100 μM)

Controle positivo: oximetazolina (agonista) e RX821002 (antagonista)

Referência: Bylund et al., *J. Neurosci. Methods* 105: 159–166, 2001; Pompeu et al. *Eur. J. Med. Chem.* 66: 122-134, 2013



Relevância:

- Princípio do ensaio de GTP-shift: ver explicações na p. 7
- Foi demonstrado que antagonistas do receptor α_{2A} podem ser úteis no tratamento da esquizofrenia, como adjuvante à terapia clássica com antagonistas D2, para reduzir os sintomas negativos (*Schizophrenia Res.* 134: 202-206, 2012). Desta forma, dentro do conceito de polifarmacologia intramolecular (*multi-target drug*), a caracterização de uma boa afinidade e correta atividade intrínseca para o receptor α_{2A} pode ser considerado uma qualidade desejada para um candidato à fármaco antipsicótico.

Benzodiazepina (central): [³H]-Flunitrazepam

Número de catálogo: R5

Código de preço:

Tecido: Cérebro de rato (sinaptossomas, preparação bruta, ie contendo GABA endógeno)

Ligante: [³H]-Flunitrazepam (0,2 nM)

$B_{max} = 2,2 \pm 0,1 \text{ pmol/mg proteína}$

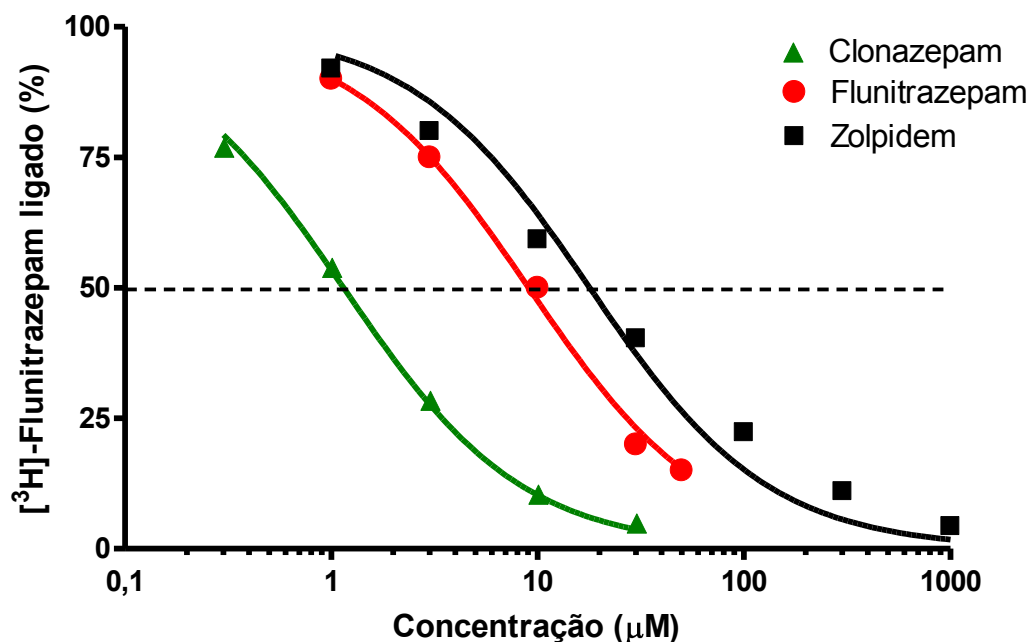
$K_d = 2,7 \pm 0,1 \text{ nM}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 0,93 \text{ (nM)}$

Não-específico: Flunitrazepam (50 μM)

Controle positivo: Clonazepam (CI_{50} : 1 nM); Flunitrazepam (CI_{50} : 3-10 nM); Zolpidem (20-49 nM); RO5-4864 (CI_{50} : 33 μM)

Referência: Lopez et al. Eur. J. Pharmacol. 495: 87-96, 2004; Noël et al., Parasitology 134: 1003-1012, 2007



Relevância:

O receptor $GABA_A$ é o maior responsável pelo efeito inibitório pós-sináptico no sistema nervoso central de mamíferos. Este receptor exhibe sítios de ligação para o GABA, neurotransmissor fisiológico que abre o canal de cloreto, e sítios moduladores, um dos quais liga as benzodiazepinas (BZP). Os agonistas para este sítio BZP, como o flunitrazepam, são usados clinicamente como sedativo-hipnótico, ansiolítico, relaxante muscular e/ou anticonvulsivante. Os antagonistas (como o flumazemil) são usados no tratamento de intoxicação com os agonistas. Nesta preparação bruta (não lavada, portanto contendo GABA endógeno - Noël et al., *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 51: 169-173, 2001), pode-se detectar o efeito inibidor dos antagonistas no sítio do GABA (ex: bicuculina).

Benzodiazepina (central): [³H]-Flunitrazepam (GABA-shift)

Número de catálogo: R5F*

Código de preço:

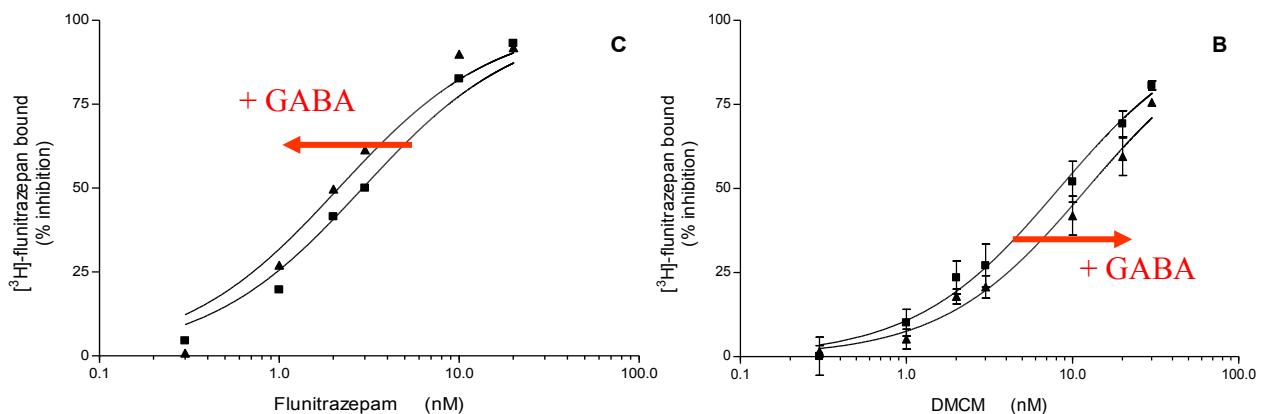
Tecido: Cérebro de rato (sinaptossomas, preparação extensivamente lavada na qual foi retirado tudo o GABA endógeno).

Ligante: [³H]-Flunitrazepam (0,2 nM), na presença e ausência de GABA 20 nM

Não-específico: Flunitrazepam (50 μM)

Controle positivo: Flunitrazepam (CI₅₀: 0,8 nM) e DMCM (CI₅₀: 8 nM)

Referência: Braestrup et al., *Biochem. Pharmacol.* 33, 859– 862, 1984; Lopez et al. *Eur. J. Pharmacol.* 495: 87-96, 2004



Relevância:

Na ausência de GABA endógeno que caracteriza esta preparação, a adição de GABA no meio de incubação (se ligando ao sítio do GABA) aumenta a afinidade dos agonistas do sítio benzodiazepínico como no caso do flunitrazepam (portanto a curva de competição é deslocada para a esquerda), como resultado de um efeito alostérico.

Caso o agente competidor for um antagonista do sítio benzodiazepínico, as duas curvas são sobrepostas (a adição de GABA ao meio não altera a afinidade de um antagonista benzodiazepínico).

Caso o GABA deslocar a curva do composto para a direita, é sinal de que o agente competidor é um agonista inverso do sítio BZP, como no caso do DMCM.

Benzodiazepina (periférico): [³H]-PK11195

Número de catálogo: R6

Código de preço:

Tecido: rim de rato

Ligante: [³H]-PK11195 (0,2 nM)

$B_{max} = \pm \text{ pmol/mg proteína}$

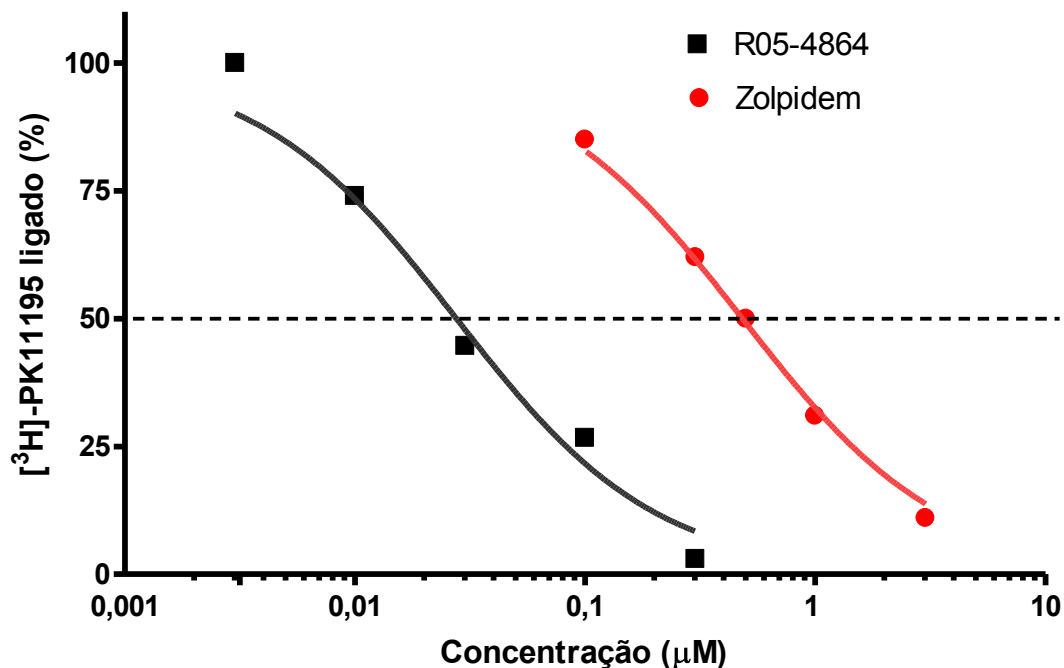
$K_d = \pm \text{ nM}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / ? \quad (\text{nM})$

Não-específico: PK11195 (1 μM)

Controle positivo: RO5-4864 (CI_{50} : 25 nM); Zolpidem (CI_{50} : 490 nM); Flunitrazepam (CI_{50} : 30 nM); Clonazepam (CI_{50} : 11 μM)

Referência: Noël et al., *Parasitology* 134: 1003-1012, 2007



Relevância:

O receptor benzodiazepínico periférico (PBR) encontra-se em tecidos periféricos (principalmente em tecidos secretores) mas também em células gliais. Sua localização subcelular é preferencialmente mitocondrial, onde participa do complexo MPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*), crítico para coordenação entre citossol e matriz mitocondrial.

Este receptor exerceria um papel na esteroidogênese (via transporte de colesterol), apoptose e patogênese de desordens neurodegenerativas

Uso clínico: ? agonistas do PBR: papel protetor contra danos que levam a apoptose, como formas reativas de oxigênio e $\text{TNF}\alpha$. ? antagonistas do PBR: potencial efeito anti-tumoral, por apoptose

Canal de cálcio voltagem-dependente (tipo L): [³H]-PN200-110

Número de catálogo: R7

Código de preço:

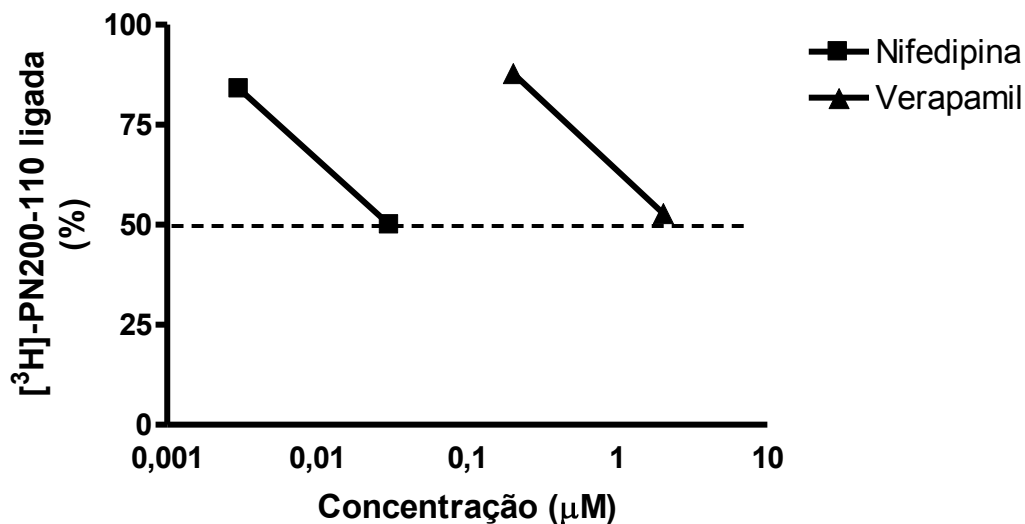
Tecido: microsomas de coração de rato

Ligante: [³H]-PN200-110 (0,1 nM)

Não-específico: Nifedipina (1 μM)

Controle positivo: Nifedipina (CI₅₀: 30 nM); Verapamil (CI₅₀: 2 μM)

Referência: *Circ. Res.* 62: 91-96, 1988; *Circ. Res.* 68: 662-673, 1991; Noël *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 41: 313-315, 1991.



Relevância:

Os canais de cálcio do tipo L têm importante função fisiológica, principalmente no aparelho cardiovascular. Substâncias que se ligam ao sítio de ligação das diidropiridinas podem ter efeito antiarrítmico (verapamil) e vasodilatador (nifedipina) ao bloquear estes canais ou efeito contraturante ao abri-los. Portanto, estes sítios constituem importantes alvos para fármacos com potencial terapêutico no tratamento da hipertensão e da angina de peito, como é o caso da nifedipina e de outras diidropiridinas muito empregadas na clínica.

Canal de cálcio sensível à rianodina: [³H]-rianodina

Número de catálogo: R8

Código de preço:

Tecido: microsomas de coração de rato ; microsomas de gastrocnemius de rato

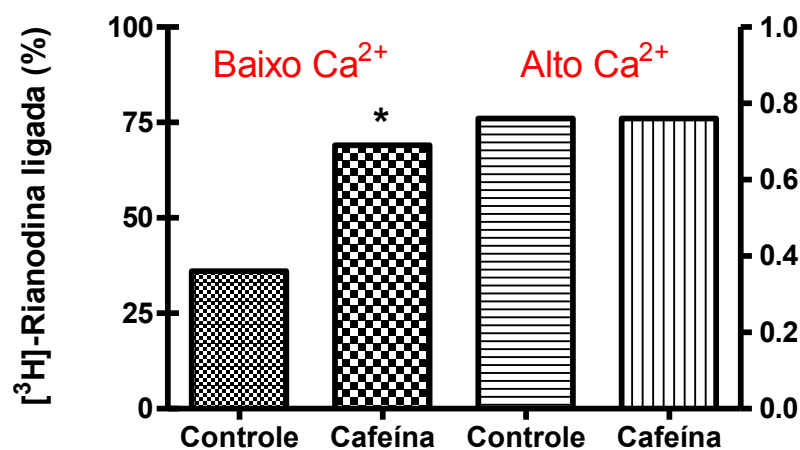
Ligante: [³H]-rianodina (1 nM)

Não-específico: rianodina (10 μM)

Meio de incubação: concentração de cálcio livre: alta (107 μM) ou baixa (0,3 μM)

Controle positivo: rianodina (CI₅₀: 10 nM)

Referência: *Circ. Res.* 68: 662-673, 1991; *Biochem. J.* 297: 415-423, 1994; Noël et al., *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 51: 169-173, 2001



Relevância:

O objetivo do ensaio é de avaliar se a substância é capaz de se ligar ao sítio de ligação da rianodina (RyR/canal de cálcio presente no retículo endo/sarcoplasmático). Este canal tem papel importante na homeostasia do cálcio em células musculares e não-musculares. Substâncias que abrem este canal (eg. cafeína) esvaziam os estoques de cálcio, diminuindo assim a contração do músculo em resposta à despolarização ou à elevação dos níveis intracelulares de cálcio. Como a [³H]-rianodina pode ser considerada um ligante sensível para avaliar o estado funcional do canal (*Ann. Rev. Physiol.* 56: 485-508, 1994), uma modificação do seu *binding* é esperada caso uma substância altere a conformação do canal, quer seja por ligação no próprio sítio da rianodina ou por interação alostérica. A preparação de músculo esquelético é usada por conter majoritariamente a isoforma RyR1 do receptor e a preparação de coração por conter a isoforma RyR2. O uso de um meio com baixa concentração de cálcio permite detectar o efeito estimulador de substâncias como a cafeína, que atuam alostericamente ao aumentar a afinidade do cálcio (*Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 51: 169-173, 2001). Tal efeito não pode ser detectado na presença de alta concentração de cálcio, usada classicamente por favorecer a ligação da rianodina.

Dopamina (D₁): [³H]-SCH23390

Número de catálogo: R9

Código de preço:

Tecido: Estriado de rato (sinaptossomas):

Ligante: [³H]-SCH23390 (0,2 nM)

$B_{max} = 742 \pm 41$ fmol/mg proteína

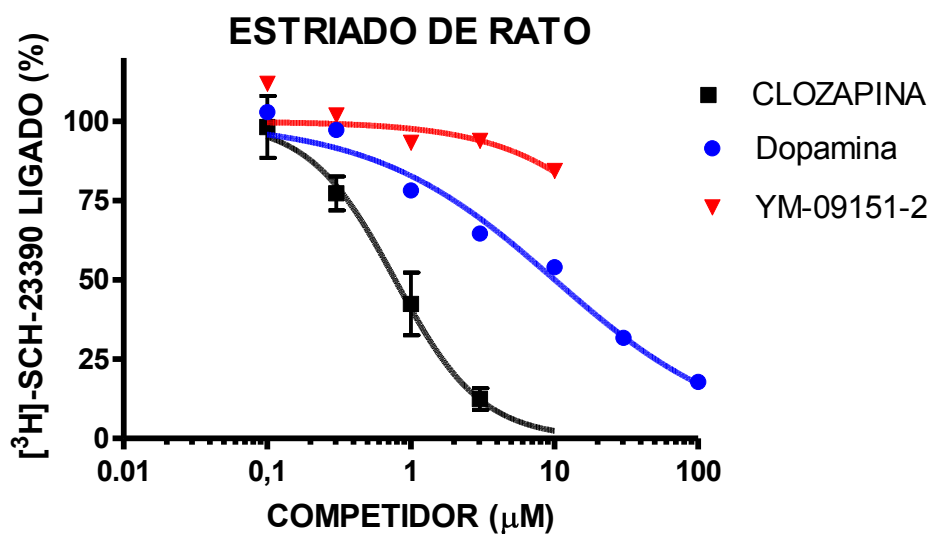
$K_d = 0,55 \pm 0,08$ nM (n=2)

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 1,04$ (nM)

Não-específico: dopamina (1 mM)

Controle positivo: YM-09151-2 (CI_{50} : nM); Clozapina (CI_{50} : nM); dopamina

Referências: *Eur.J.Pharmacol.* 194:17, 1991; *Eur.J.Pharmacol.* 363: 211–215, 1998



Relevância:

A ativação de receptores D₁ é crucial para a memória de trabalho e a função de atenção, que são fortemente prejudicadas na Esquizofrenia (*Eur.Neuropsychopharmacol.* 23: 769–778, 2013). Assim sendo, agonistas D₁ são apontados como possíveis ferramentas farmacológicas para tratamento dos déficits cognitivos na Esquizofrenia e doença de Parkinson (*Nature Rev. Drug. Discover.* 11: 141-168, 2012).

Dopamina (D₂-like): [³H]-YM-09151-2

Número de catálogo: R10

Código de preço:

Tecido: Estriado de rato (sinaptossomas): principalmente do tipo D2

Ligante: [³H]-YM-09151-2 (nemonaprida - 0,1 nM), antagonista

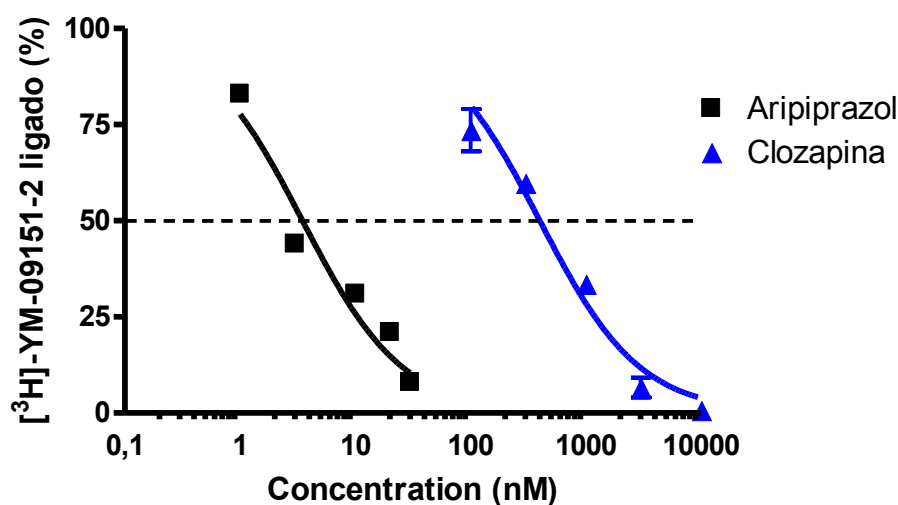
$B_{max} = 0,78 \pm 0,07 \text{ pmol/mg proteina}$ $Kd = 0,42 \pm 0,01 \text{ nM (n=2)}$

Cálculo do Ki = CI₅₀ / 1,24 (nM)

Não-específico: Sulpirida (30 µM)

Controle positivo: aripiprazol (CI₅₀: 3,5 nM); clozapina (CI₅₀: 429 nM)

Referência: Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 329: 333, 1985 ; Eur. J. Pharmacol. 173: 177, 1989 ; Life Sciences 50: 1529, 1992 ; Eur. J. Pharmacol. 237: 183, 1993.



Relevância:

Esquizofrenia: antagonistas (ou agonistas parciais) D2 : este bloqueio é considerado como responsável pela melhoria dos sintomas positivos da esquizofrenia observada com os antipsicóticos (típicos e atípicos).

Antagonistas D4: ? (hipótese não confirmada pelos estudos clínicos)

Parkinson: agonistas (não seletivos ou D2 / D3): para compensar perda de atividade dopaminérgica no estriado decorrente de perda neuronal na substância negra.

Dopamina (D₃): [³H]-YM-09151-2

Número de catálogo: R11

Código de preço:

Tecido: Membranas de células transfectadas com receptor D3 humano

Ligante: [³H]-YM-09151-2 (nemonaprida - 0,1 nM) (ligante para receptores D2, D3 e D4)

$B_{max} = \pm$ pmol/mg proteína

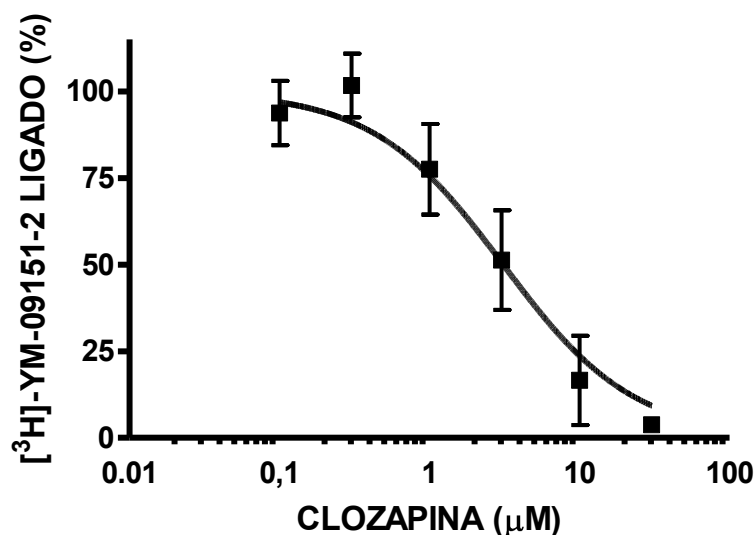
$Kd = \pm$ nM (n=2)

Cálculo do $Ki = CI_{50} /$ (nM)

Não-específico: Clozapina (10 μ M)

Controle positivo: YM-09151-2 (CI_{50} : nM); Clozapina (CI_{50} : nM)

Referências: Tang et al., J. Pharmacol. Ther. 268: 495-502, 1994.



Relevância:

Esquizofrenia: O bloqueio seletivo dos receptores D3 continua sendo considerado como uma alternativa para o tratamento da esquizofrenia, tendo em vista os possíveis benefícios no tratamento dos sintomas negativos e cognitivos (Gross et al. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 386:155–166, 2013)

Dependência a drogas: Estes receptores D3 estão densamente presentes no sistema mesolímbico responsável pela aprendizagem relacionada com a recompensa induzida pela cocaína e estão sendo considerados atualmente como alvos para tratamento de dependência (Newman e cols., 2012). Antagonistas do receptor D3 inibem as ações da cocaína em modelos pré-clínicos (Matuskey e cols., 2014). Fenilpiperazinas com seletividade para este sub-tipo de receptor dopaminérgico tem demonstrado eficácia na redução da dependência a cocaína em animais (Cheung e cols., 2013).

Dopamina (D₄): [³H]-YM-09151-2

Número de catálogo: R12

Código de preço:

Tecido: Membranas de células transfectadas com receptor D4 humano

Ligante: [³H]-YM-09151-2 (nemonaprida - 0,1 nM) (ligante para receptores D2, D3 e D4)

$B_{max} = 47,4 \pm 10,4 \text{ pmol/mg proteína}$

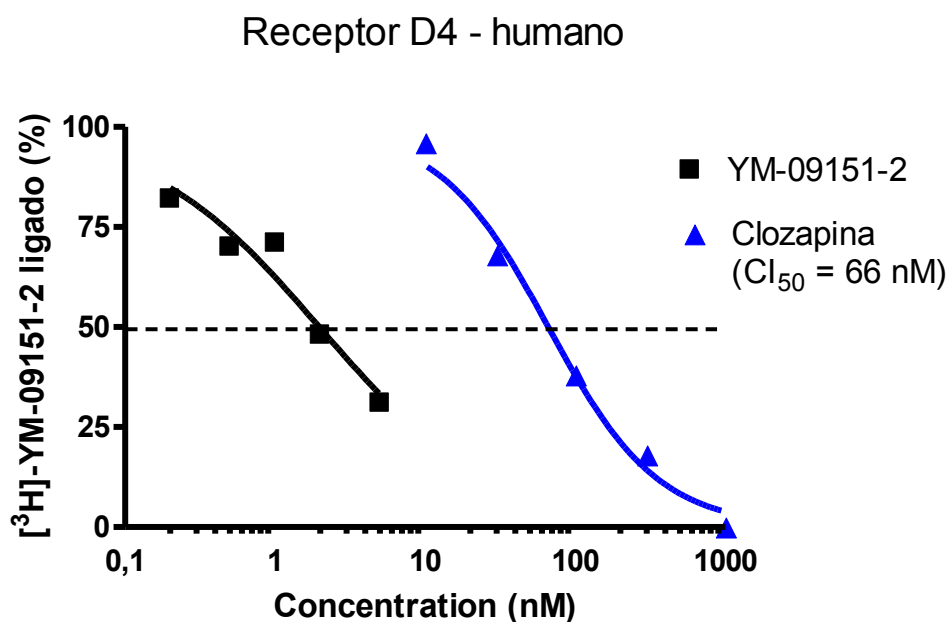
$Kd = 2,74 \pm 0,01 \text{ nM (n=2)}$

Cálculo do $Ki = CI_{50} / 1,04 \text{ (nM)}$

Não-específico: Clozapina (10 μ M)

Controle positivo: YM-09151-2 (CI_{50} : 2 nM); Clozapina (CI_{50} : 66 nM)

Referências: *Nature* 350: 610, 1991; *Eur. J. Pharmacol.* 236: 483, 1993; *J. Neurochem.* 63: 62, 1994.



Relevância:

Esquizofrenia: antagonistas D4. Apesar de não haver consenso, o bloqueio de receptores D4 poderia ser (em parte) responsável pelo efeito antipsicótico da clozapina (atípico) pelo qual tem maior afinidade do que para o receptor D2.

Dopamina (D₄): [³H]-YM-09151-2 (GTP shift)

Número de catálogo: R12F*

Código de preço:

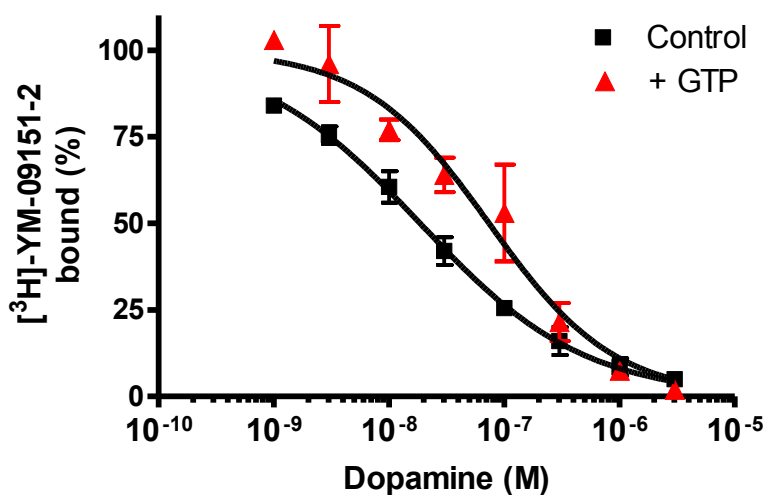
Tecido: Membranas de células transfectadas com receptor D4 humano

Ligante: [³H]-YM-09151-2 (nemonaprida - 0,1 nM) (ligante para receptores D2, D3 e D4) na presença e ausência de GTP em largo excesso (1 mM)

Não-específico: Clozapina (10 μM)

Controle positivo: dopamina (agonista)

Referência: Betti et al., dados em preparação para publicação



Relevância:

- Princípio do ensaio de GTP-shift: ver explicações na p. 7
- Apesar de não haver consenso, o bloqueio de receptores D4 poderia ser (em parte) responsável pelo efeito antipsicótico da clozapina (atípico) pelo qual tem maior afinidade do que para o receptor D2.

Glutamato (tipo cainato): [³H]-KA

Número de catálogo: R13

Código de preço:

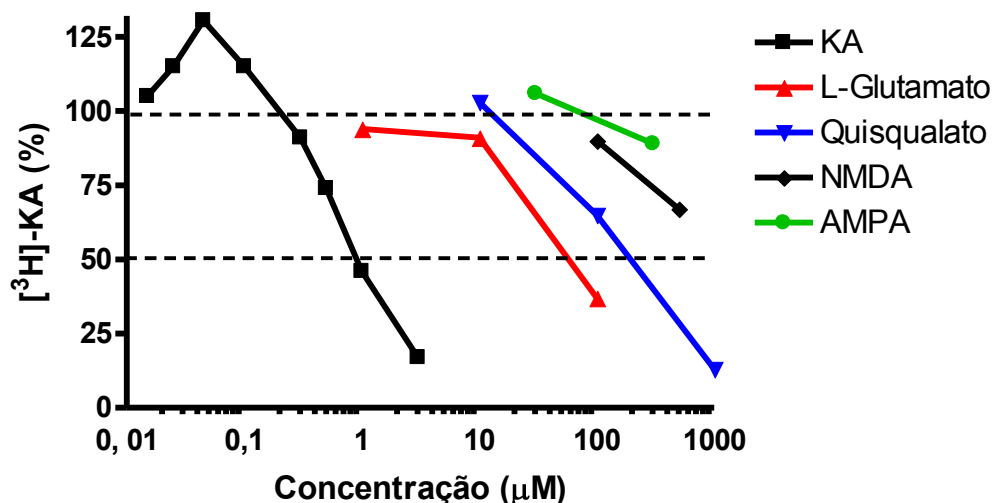
Tecido: Cerebelo de galinha (sítios de ligação de baixa afinidade)
Cérebro de rato (sítios de alta afinidade)

Ligante: [³H]-KA (5 nM)

Não-específico: Galinha: KA (100 µM); Rato: KA (500 µM).

Controle positivo: Galinha: KA (CI₅₀: 1 µM); Rato : KA (CI₅₀: 21 nM)

Referência: *Biochem. Pharmacol.* 64: 1337-1344, 2002; Noël *et al.*, *Arzneim.-Forschung./Drug Res.* 51: 169-173, 2001.



Relevância:

O receptor cainato é um dos principais responsáveis pela resposta glutamatérgica excitatória rápida no sistema nervoso central de mamíferos. Quando ativado pelo neurotransmissor fisiológico L-glutamato, este receptor ionotrópico se torna permeável aos íons sódio e potássio. A toxicidade promovida pela entrada destes cátions pode levar a morte celular.

- A preparação de cerebelo de galinha possui uma alta densidade de sítios de ligação de baixa afinidade para o KA, semelhantes aos presentes em mamíferos.
- Já a preparação de cérebro de rato apresenta somente sítios de alta afinidade na presença de GTP 1 mM (Gorondisky *et al*, 1993).

Ainda é incerto se antagonistas do receptor cainato ofereceriam efeito neuroprotetor.

NB. No caso do ácido cainico (KA), o aumento da ligação de [³H]-KA em baixas concentrações de KA não radioativo (curva em sino) se explica pelo fenômeno de cooperatividade positiva (*Arzneim.-Forschung./Drug Res.* 51: 169-173, 2001).

Glutamato (tipo AMPA): [³H]-AMPA

Número de catálogo: R14

Código de preço:

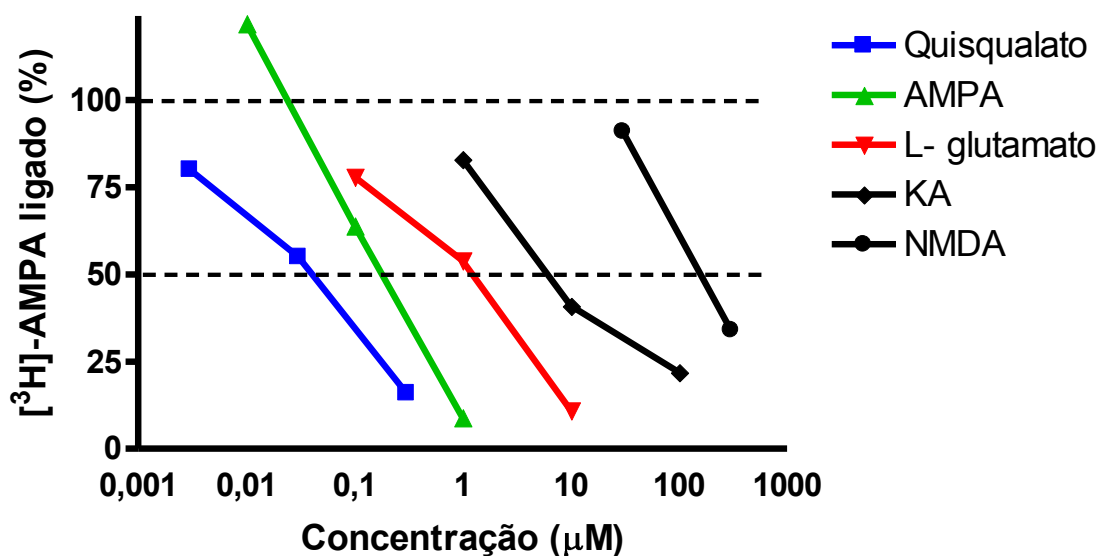
Tecido: Hemisfério cerebral de rato

Ligante: [³H]-AMPA (5 nM)

Não-específico: L-glutamato (1 mM).

Controle positivo: AMPA (CI₅₀: 0,2 μM)

Referência: *Biochem. Pharmacol.* 64: 1337-1344, 2002



Relevância:

O receptor AMPA é um dos principais responsáveis pela resposta glutamatérgica excitatória rápida no sistema nervoso central de mamíferos. Este receptor quando ativado pelo neurotransmissor fisiológico L-glutamato ou pelo L-aspartato, abre canais catiônicos permeáveis aos íons sódio e potássio. A toxicidade promovida pela entrada destes cátions pode levar a morte celular.

Antagonistas competitivos e não-competitivos do AMPA podem ser neuroprotetores (como demonstrado em modelos de isquemia tanto focal quanto global) diferenciando-se quanto à existência de efeitos adversos: antagonistas não-competitivos seriam mais efetivos no bloqueio deste receptor na presença de concentrações tóxicas de glutamato, do que os antagonistas competitivos.

Moduladores positivos do AMPA teriam efeito nootrópico.

Glutamato (tipo NMDA): [³H]-MK-801

Número de catálogo: R15

Código de preço:

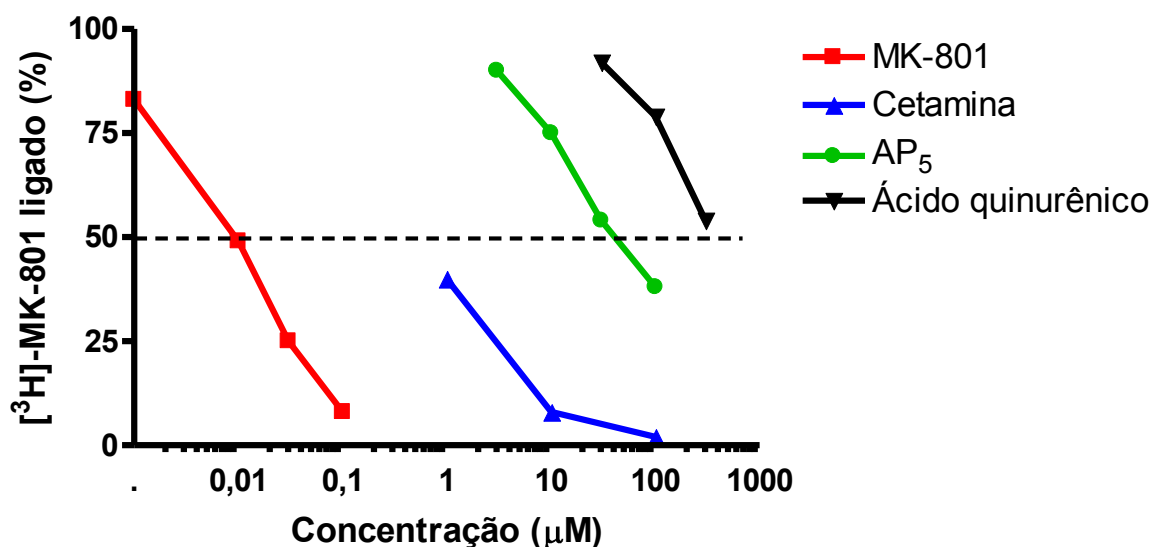
Tecido: Hemisfério cerebral de rato (microsomas)

Ligante: [³H]-MK-801 (2 nM)

Não-específico: Cetamina (3 mM)

Controle positivo: MK-801 (CI₅₀: 10 nM)

Referência: *Biochem. Pharmacol.* 69: 1509-1516, 2005



Relevância: O receptor glutamatérgico do tipo NMDA está envolvido em importantes processos fisiológicos (e.g. desenvolvimento e aprendizado), assim como no fenômeno de excitotoxicidade (um dos fatores que levam à morte celular necrótica devida à isquemia, injúria traumática cerebral, hipoglicemia e crise de epilepsia). A ativação de receptores glutamatérgicos pode também participar como fator etiológico de doenças neurodegenerativas crônicas específicas como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington. O receptor NMDA exibe sítios de ligação para a glicina, co-agonista, e para o L-glutamato, neurotransmissor fisiológico que abre um canal permeável aos íons cálcio e sódio; além de sítios moduladores, um dos quais ligam as fenciclidinas e o MK-801 (sítio localizado no interior do canal iônico). Os bloqueadores do canal são usados como anestésicos dissociativos (ex: cetamina). O ensaio de competição usando [³H]-MK-801 como marcador e preparação bruta de cérebro (contendo glutamato e glicina endógena) permite identificar não somente ligantes do sítio das fenciclidinas, como também antagonistas competitivos do glutamato (ex: AP₅) e da glicina (ex: ácido quinurênico). Nota-se que bloqueadores do sítio da glicina poderiam apresentar menos efeitos adversos do que antagonistas competitivos ou bloqueadores do canal. Agonistas do sítio da glicina são avaliados para melhorar os sintomas negativos e déficits cognitivos presentes na esquizofrenia (hipótese glutamatérgica).

Muscarínico (não seletivo/M1): [³H]-QNB

Número de catálogo: R16

Código de preço:

Tecido: Córtex de rato (sinaptossomas):

Proporção dos diferentes sub-tipos de receptores muscarínicos nesta preparação:

36-48 % (M1), 18-21 % (M2), 13-25% (M3), 11-16% (M4), 4-7% (M5)

(*Mol. Pharmacol.* 61:1267-1272, 2002; *Mechanism Ageing Develop.* 127: 115-122, 2006)

Ligante: [³H]-QNB (0,1 nM), antagonista (ligante não seletivo)

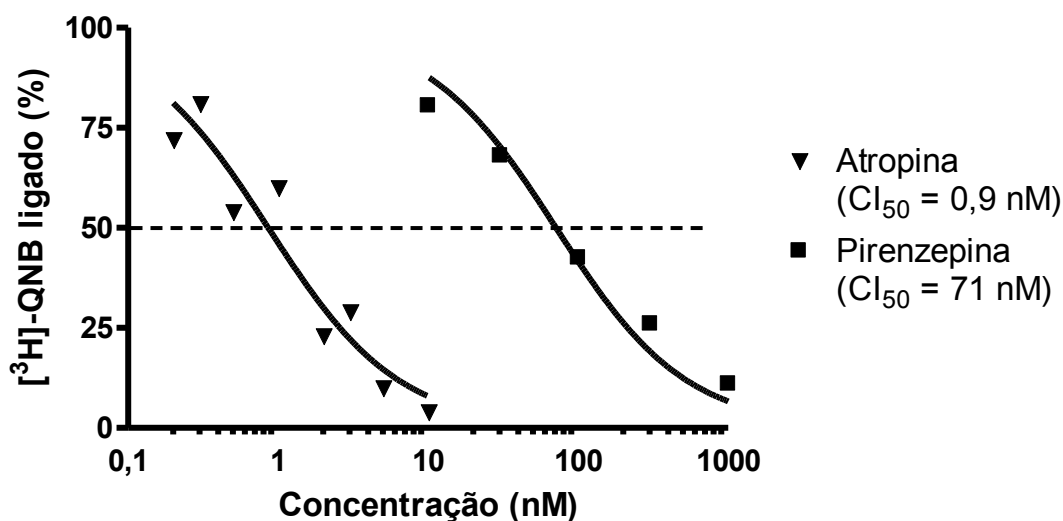
$B_{max} = \pm \text{ pmol/mg proteína}$ $K_d = \pm$

Cálculo do $K_i = CI_{50} /$ (nM)

Não-específico: Sulfato de atropina (1 μ M)

Controle positivo: atropina (CI_{50} : 1 nM); pirenzepina (65 nM)

Referência: Richards, *Br. J. Pharmacol.* 99:753-761, 1990; Castoldi et al. *Life Sciences* 78:1915– 1924, 2006



Relevância:

Doenças e potenciais alvos para fármacos (IUPHAR database):

- Alzheimer: agonistas M1 e M5 / antagonistas M2
- Esquizofrenia : agonista M1 e M4, mas o bloqueio M1 seria responsável, em parte, pela diminuição de efeitos extrapiramidais (mas aumento de efeitos adversos atropínicos) de antipsicóticos como clozapina.
- Parkinson: antagonistas M1 e M4
- DPOC, asma : antagonistas M2 e M3
- Obesidade: antagonistas M3
- Dependência à drogas : antagonistas M5

Serotonina (5-HT_{1A} - agonista): [³H]-8-OH-DPAT

Número de catálogo: R17

Código de preço:

Tecido: Hipocampo de rato (sinaptossomas): rec. Pós-sinápticos (= 5-HT_{1A} ?)

Ligante: [³H]-8-OH-DPAT (1 nM), agonista

$B_{max} = 125 \pm 42 \text{ fmol/mg proteina}$

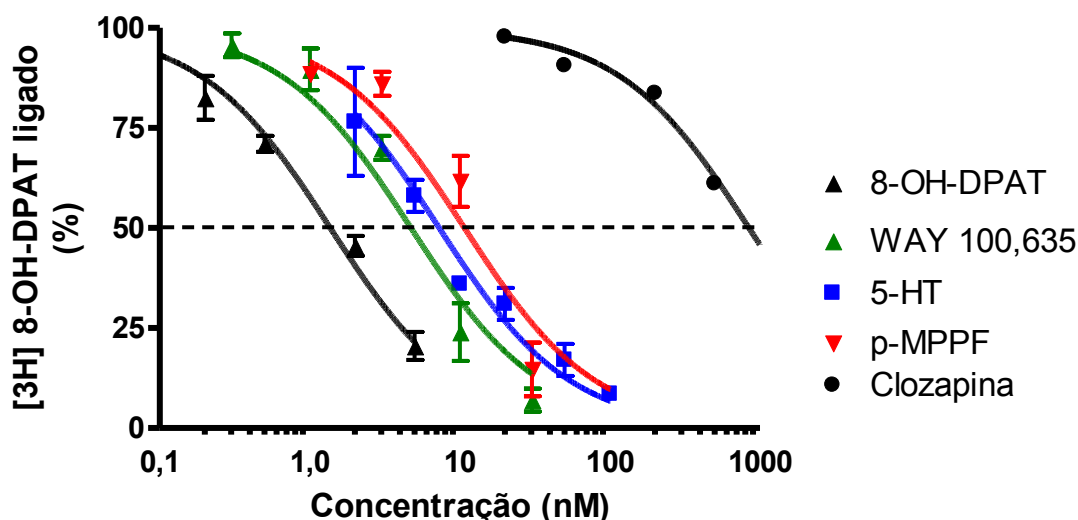
$K_d = 0,7 \pm 0,1 \text{ nM (n=2)}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 2,43 \text{ (nM)}$

Não-específico: 5-HT (10 μ M)

Controle positivo: 5-HT (CI_{50} : 7,3 nM); 8-OH-DPAT (CI_{50} : 1,4 nM); Clozapina (CI_{50} : 850 nM); p-MPPF (CI_{50} : 11nM); WAY 100,635 (CI_{50} : 4,7 nM)

Referência: *J. Neurochem.* 44: 1685, 1985; *Brain Res.* 590: 229, 1992; Pompeu et al., *J. Med. Chem.* 66: 122-134, 2013; Noël et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, no prelo



Relevância:

- Os receptores 5-HT_{1A} são expressos como auto-receptores pelos neurônios 5-HT nos núcleos da rafe e são também amplamente distribuídos no sistema límbico onde seriam os alvos principais dos fármacos usados para tratar ansiedade e depressão (agonistas 5-HT_{1A} tem efeito ansiolítico (buspirona) e antidepressivo).

Esquizofrenia: alguns antipsicóticos atípicos possuem um efeito agonista nestes receptores (aripirazole: agonista parcial; ziprasidona: agonista total).

Ansiedade, depressão: azapironas como a buspirona, gepirona e tandospirona são agonistas (parciais) 5-HT_{1A} comercializados primeiramente como ansiolíticos mas também, recentemente, como antidepressivos.

Depressão: uma atividade agonística (parcial, no autoreceptor receptor somatodendrítico) faria parte do mecanismo de ação de alguns antidepressivos (buspirona).

Serotonina (5-HT_{1A} - antagonista): [³H]-pMPPF

Número de catálogo: R18

Código de preço:

Tecido: Hipocampo de rato (sinaptossomas): rec. Pós-sinápticos (= 5-HT_{1A} ?)

Ligante: [³H]-pMPPF (0,5 nM), antagonista

$B_{max} = 144 \pm 9,7 \text{ fmol/mg proteína}$

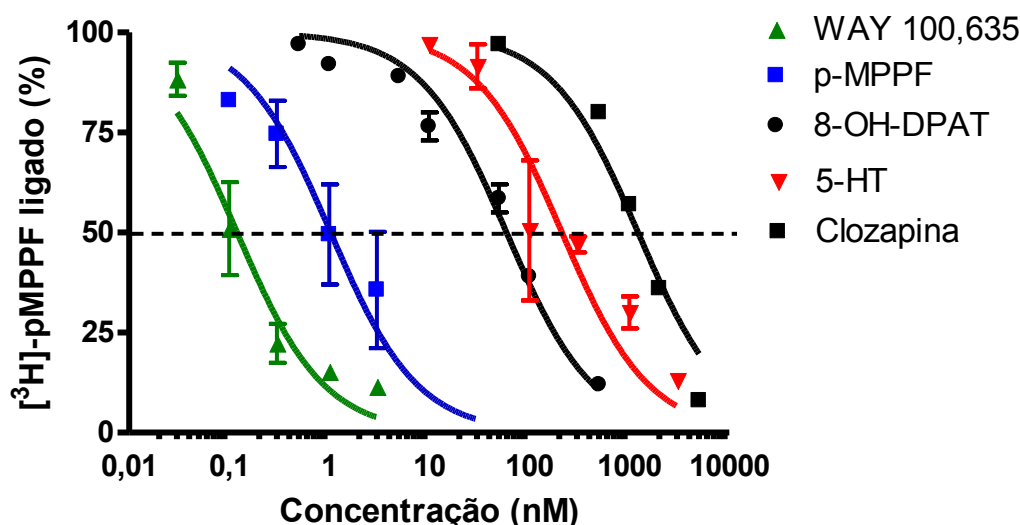
$K_d = 0,855 \pm 0,055 \text{ nM (n=2)}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 1,58 \text{ (nM)}$

Não-específico: 5-HT (10 μ M)

Controle positivo: 5-HT (CI_{50} : 300 nM); 8-OH-DPAT (CI_{50} : 60 nM); Clozapina (CI_{50} : 1230 nM); pMPPF (CI_{50} : 1 nM); WAY 100,635 (CI_{50} : 0,12 nM)

Referência: *Eur. J. Pharmacol.* 386: 97-103, 1999 ; *Pompeu et al., J. Med. Chem.* 66: 122-134, 2013.



Relevância:

O ensaio de competição usando-se um radioligante antagonista (como pMPPF) permite calcular o valor de K_i de ligantes ao estado de baixa afinidade do receptor e assim calcular a razão de K_i (antagonista/agonista) que permite avaliar a eficácia intrínseca do ligante (ver ensaio R13)

Serotonina (5-HT_{1A} - agonista): [³H]-pMPPF (GTP-shift)

Número de catálogo: R18F*

Código de preço:

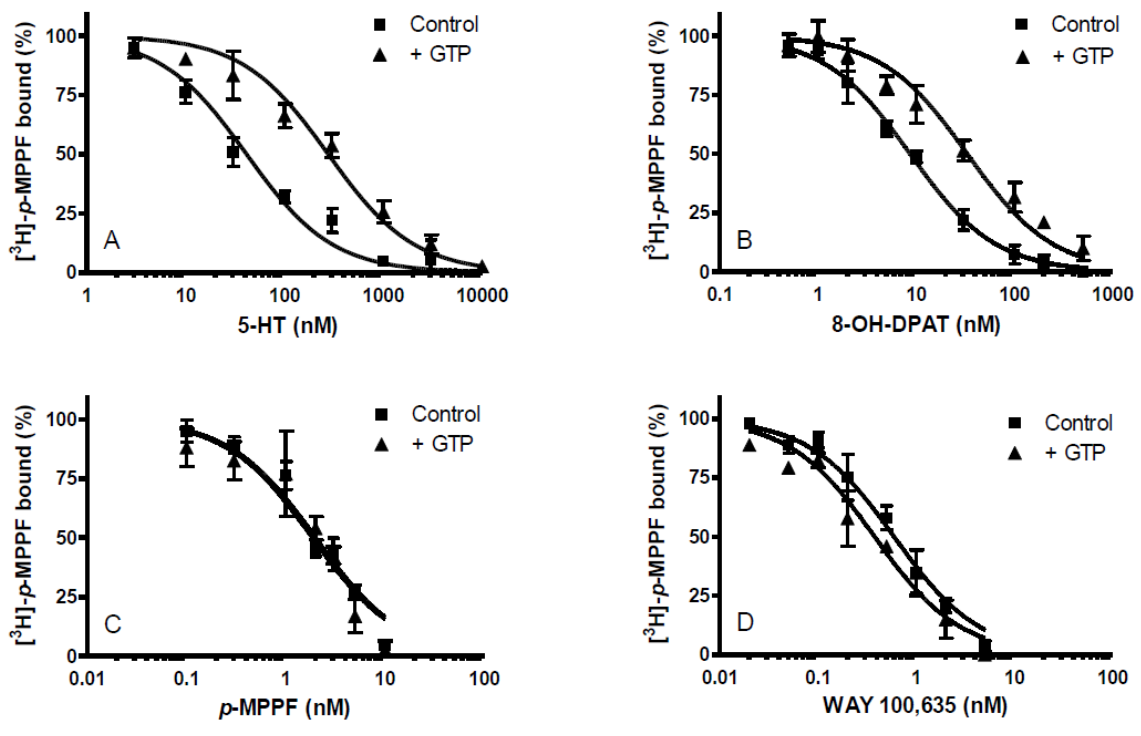
Tecido: Hipocampo de rato (sinaptossomas): rec. Pós-sinápticos (= 5-HT_{1A} ?)

Ligante: [³H]-pMPPF (0,5 nM), antagonista, na presença e ausência de GTP em largo excesso (1 mM)

Não-específico: 5-HT (10 μM)

Controle positivo: 5-HT (agonista); 8-OH-DPAT (agonista parcial, de alta-moderada atividade intrínseca); p-MPPF (antagonista); WAY 100,635 (agonista inverso)

Referência: Pompeu et al., *J. Med. Chem.* 66: 122-134, 2013; Noël et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, no prelo.



Relevância:

- Princípio do ensaio de GTP-shift: ver explicações na p. 7
- **Esquizofrenia:** o fato de ter atividade agonística no rec. 5-HT_{1A} faria parte do mecanismo de ação de alguns antipsicóticos atípicos (ziprasidona)

Serotonina (5-HT_{2A}): [³H]-ketanserina

Número de catálogo: R19

Código de preço:

Tecido: Cérebro (córtex) de rato (sinaptossomas)

Ligante: [³H]-ketanserina (1 nM), antagonista

$B_{max} = 360 \pm 10 \text{ fmol/mg proteína}$

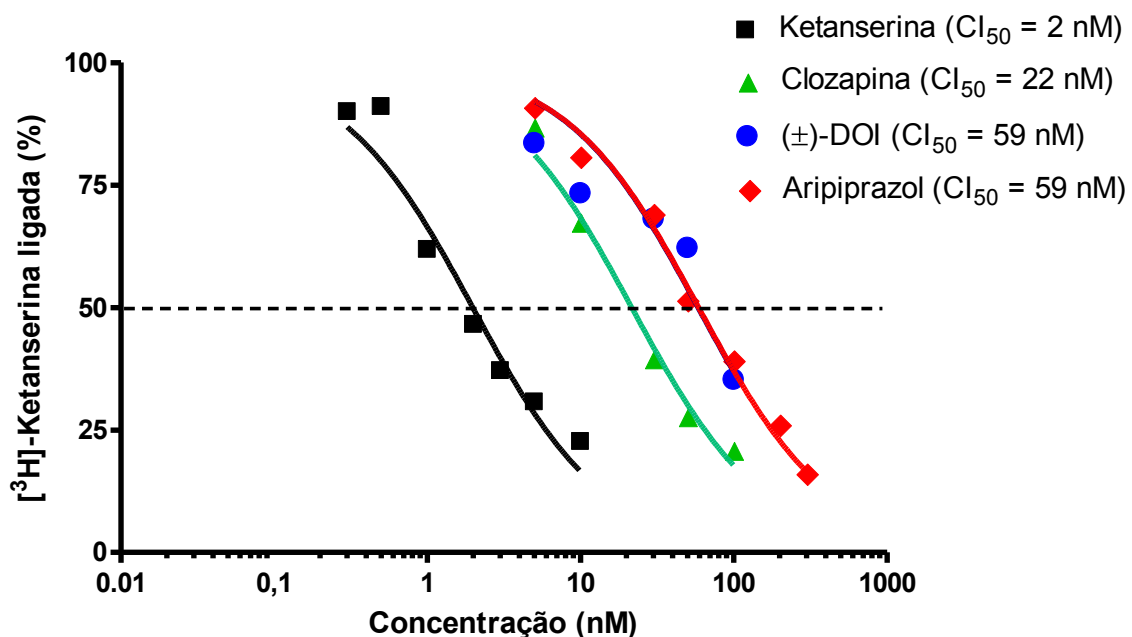
$K_d = 2,69 \pm 0,50 \text{ nM (n=3)}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / 1,37 \text{ (nM)}$

Não-específico: ketanserina (1 μM)

Controle positivo: Ketanserina (CI_{50} : 2 nM)

Referência: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 205, 1996; *Mol. Pharmacol.* 21: 301, 1982; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 1272, 1993.



Relevância:

- Os receptores 5-HT_{2A} (o “histórico” receptor 5-HT₂) são amplamente distribuído nos tecidos periféricos onde medeiam os efeitos contráteis em diversos músculos lisos vasculares e não vasculares (brônquios, útero, sistema urinário...).
- SNC: estes receptores são abundantes no córtex e no sistema límbico onde seriam alvos de fármacos alucinógenos.
- **Esquizofrenia:** o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A} seria favorável. Os antipsicóticos atípicos (clozapina, aripiprazole) possuem efeito antagonista no receptor 5-HT_{2A} além dos seus efeitos no sistema dopaminérgico. A alta razão das afinidades 5HT_{2A}/D₂ seria responsável pela menor ocorrência de efeitos extrapiramidias e pela melhoria dos sintomas negativos e dos déficits cognitivos da esquizofrenia.
- **Enxaqueca:** os antagonistas 5-HT₂ seriam úteis no tratamento da enxaqueca (metissergida).

Serotonina (5-HT_{2A}): [³H]-ketanserina (GTP-shift)

Número de catálogo: R19F*

Código de preço:

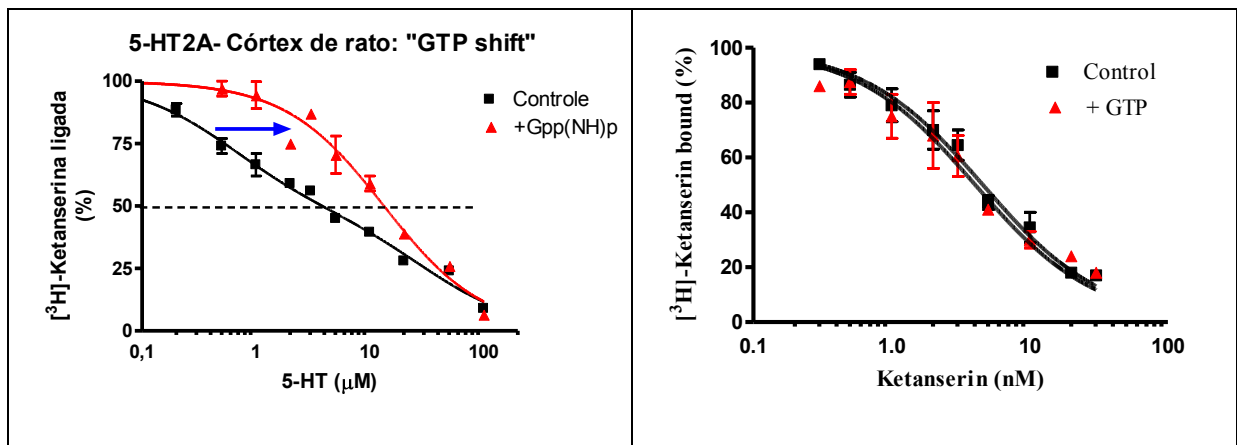
Tecido: Cérebro (córtex) de rato (sinaptossomas)

Ligante: [³H]-ketanserina (1 nM), antagonista, na presença e ausência de “GTP” (Gpp(NH)p 100 μM ou GTP em largo excesso, 1 mM)

Não-específico: ketanserina (1 μM)

Controle positivo: 5-HT (agonista) e Ketanserina (antagonista)

Referência: *Mol. Pharmacol.* 38: 604, 1990; *Pompeu et al., J. Med. Chem.* 66: 122-134, 2013.



Relevância:

- Princípio do ensaio de GTP-shift: ver explicações na p. 7
- Neste caso, a curva de competição do 5-HT na ausência de GTP apresenta uma inclinação menor do que o normal (coeficiente de Hill < 1). A adição de Gpp(NH)p (GTP não hidrolisável) ou de 1 mM GTP ao meio desloca a parte superior da curva para direita, fazendo com que a curva adquira uma inclinação normal (coeficiente de Hill, $n_H = 1$) e um valor maior de CI_{50} .
- Esquizofrenia: a maioria dos antipsicóticos atípicos tem maior afinidade para o receptor 5-HT_{2A} do que para o receptor D2, e são antagonistas nestes dois receptores.

Serotonina (5-HT_{2C}): [3H]-Mesulergina

Número de catálogo: R20

Código de preço:

Tecido: Membranas de células transfectadas com receptor 5-HT_{2C} humano

Ligante: [3H]-Mesulergina (1nM) (antagonista dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{2A} + agonista parcial D2-like)

$B_{max} = 21,1 \pm 0,3 \text{ pmol/mg proteína}$

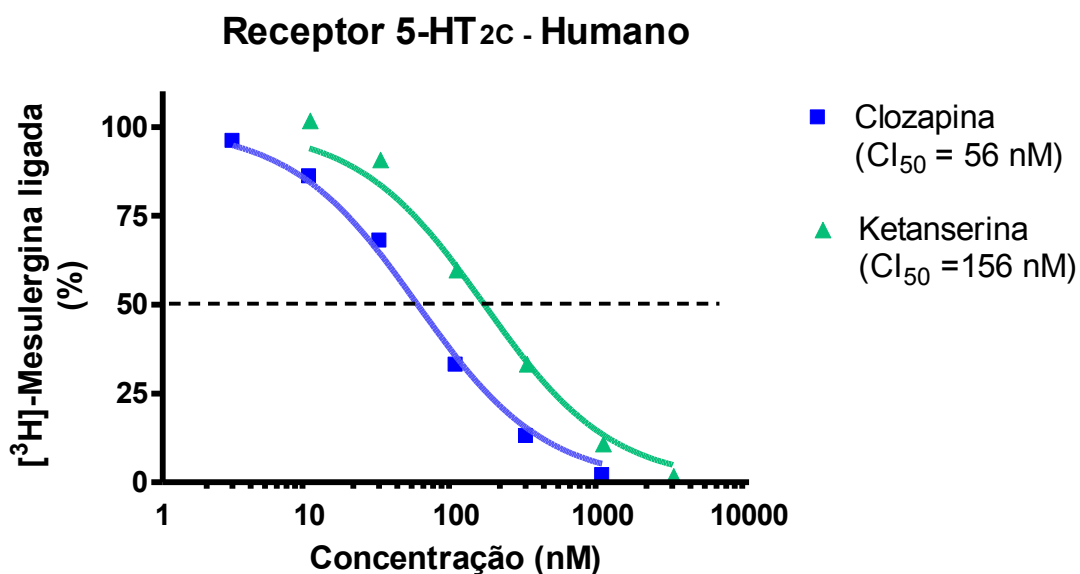
$K_d = 0,93 \pm 0,03 \text{ nM (n=2)}$

Cálculo do Ki = CI₅₀ / 2,07 (nM)

Não-específico: Serotonina (100 µM)

Controle positivo: Clozapina (pKi=7,4-8,7); Ketanserina (pKi=6,8-7,5) – IUPHARdatabase

Referências: *Arch. Pharmacol.* 370:114, 2004; *Neuropsychopharmacol.*32:1715, 2007
Neurotherapeutics 6: 78, 2009.



Relevância:

Esquizofrenia: agonista, antagonista ou agonista inverso 5-HT_{2C} ?

A ativação de receptores 5-HT_{2C} na região mesolímbica pode reduzir a transmissão dopaminérgica e melhorar os sintomas positivos da esquizofrenia. Entretanto a supressão dopaminérgica via ativação do receptor 5-HT_{2C} na região mesocortical pode potencializar a piora na cognição; na região nigroestriatal a mesma ação pode causar efeitos extrapiramidais. Acredita-se que o bloqueio de receptores 5-HT_{2C} reduza a depressão e melhore a cognição pela desinibição da liberação de dopamina e norepinefrina no córtex pré-frontal.

Efeitos adversos: o bloqueio dos receptores 5-HT_{2C} esta associado ao ganho de peso.

Obesidade: agonistas são considerados como potencialmente interessantes no tratamento da obesidade

ALDH (ALDH-2): Aldeído desidrogenase

Número de catálogo: E1

Código de preço:

Tecido: preparação mitocondrial de fígado de rato.

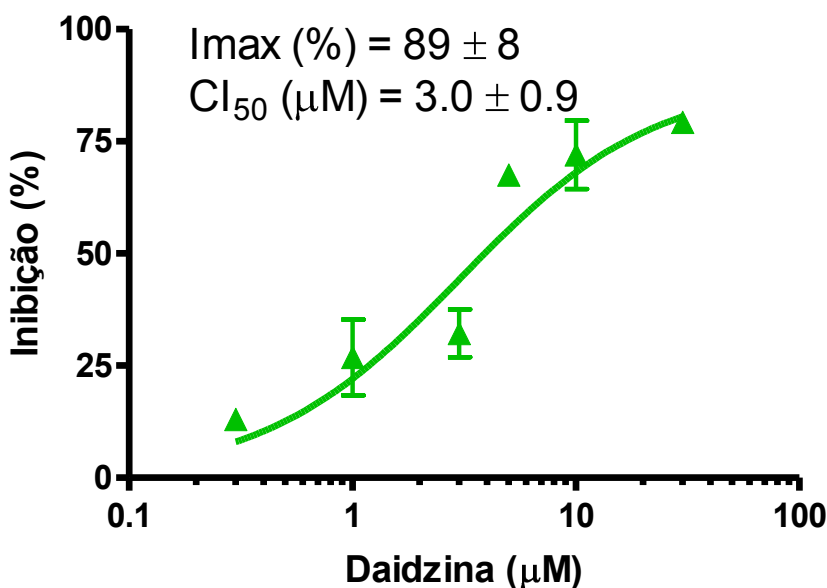
Atividade Total: kit comercial (abcam), baseado em método colorimétrico:

Acetaldeído (25 mM) + NAD⁺ (1 mM) → ácido + NADH (↑ absorbância a 450 nm)

O uso de anticorpos específicos para a isoforma ALDH2 assegura a especificidade da reação.

Controle positivo: daizina (CI₅₀: 3 μM); disulfiram (CI₅₀: 5 μM)

Referências: kit ab115348 (abcam); Keung *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 94:1675–1679, 1997; Perz-Mille *et al.*, *Nature Structural & Mol. Biol.* 17: 159-165, 2010



Relevância:

Dependência a drogas: O composto CVT-10216, cuja síntese foi guiada pela interação do isoflavonóide daizina com ALDH-2 humana (Keung e cols., 1993), se mostrou um inibidor altamente seletivo e reversível da ALDH-2 capaz de inibir a procura por cocaína em modelo animal clássico de auto-administração (Yao e cols., 2010).

ATPase: Ca²⁺-ATPase (SERCA)

Número de catálogo: E2

Código de preço:

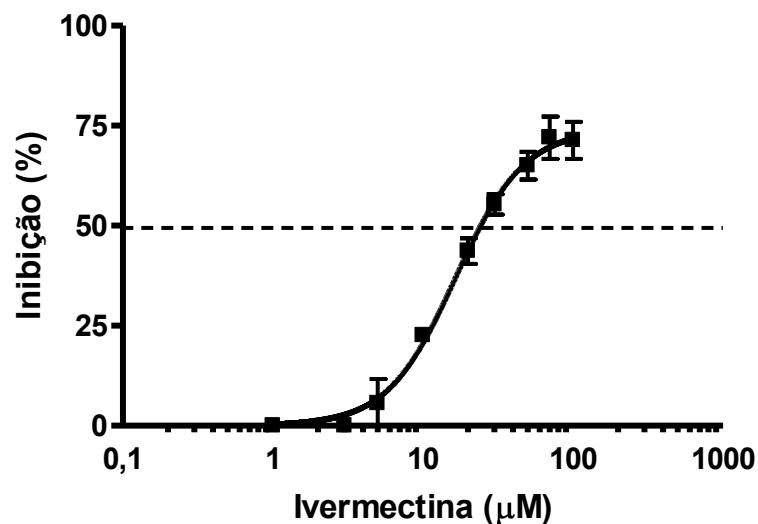
Tecido: microsomas de músculo EDL de rato (SERCA 1A)

Atividade Total:

Atividade SERCA: Atividade total - atividade medida na presença de tapsigargina

Controle positivo: Tapsigargina (CI₅₀: 13 µM); Ivermectina (CI₅₀: 21 µM)

Referências: Pimenta et al., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 381:147-152, 2010



Relevância:

Não se conhece aplicação clínica para inibidores da SERCA, mesmo se foi levantado a hipótese de uso da tapsigargina no tratamento da catarata (mas a tapsigargina é um promotor de tumor). *A priori*, uma inibição desta enzima seria considerada nefasta e assim deveria ser avaliada para estimar a seletividade de novos inibidores de Na,K-ATPase e H/K-ATPases.

Uma estimulação da SERCA poderia ser benéfica, como no caso da Istaroxina, um fármaco inotrópico devido à inibição da Na,K-ATPase, porém com menor toxicidade, provavelmente devido ao seu efeito estimulante direto da SERCA (*J. Exp. Pharmacol. Ther.* 313: 207-215, 2005)

ATPase: H⁺/K⁺-ATPase

Número de catálogo: E3

Código de preço:

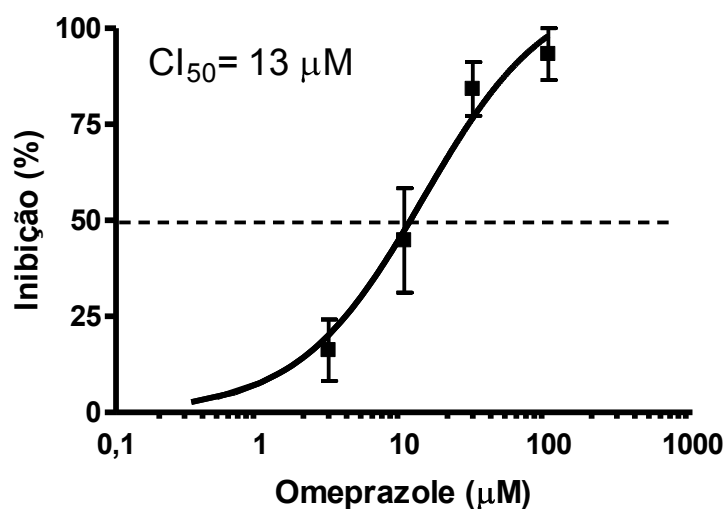
Tecido: microsomas de estômago de rato

Atividade Total: ATPNa 6,7 mM; Tampão Tris 40 mM/HCl, pH 7,4; Nigericina 5 µg/ml; MgCl₂ 4 mM; KCL 48 mM, NH₄Cl 6 mM.

Atividade H⁺/K⁺-ATPase: - Atividade total - atividade medida na ausência de KCl e NH₄Cl

Controle positivo: Omeprazole (IC₅₀: 13 µM). Nota-se que valores de 0,5 - 36 µM são relatadas, dependendo das condições experimentais).

Referências: *Eur. J. Pharmacol.* 411: 181-186, 2001; *BMC Gastroenterology* 4: 4, 2004; *Pimenta et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 381:147-152, 2010.



Relevância:

Inibidores irreversíveis desta enzima (omeprazole, pantoprazole...) são utilizados no tratamento da úlcera duodenal e gástrica e de refluxo esofágico.

ATPase: Na⁺/K⁺-ATPase

Número de catálogo: E4

Código de preço:

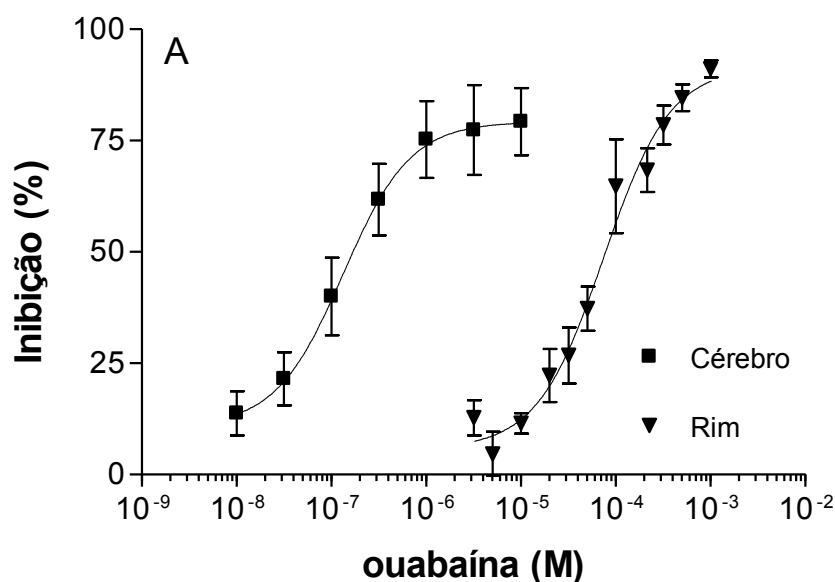
Tecido: Rins e Hemisférios cerebrais de rato (microssomas purificados)

Atividade Total: ATP 1,2 mM; Na⁺ 100 mM; Mg²⁺ 3 mM; K⁺ 3 mM

Atividade Na⁺/K⁺-ATPase: [Atividade Total]-[Atividade sensível à ouabaína 2 mM]

Controle Positivo: Ouabaína

Referência: Noël & Godfraind, *Biochem. Pharmacol.* 33: 47-53, 1984; Pôças et al. *Biochem. Pharmacol.* 66: 2169-2176, 2003.



Relevância:

A Na⁺/K⁺-ATPase é o receptor farmacológico dos glicosídeos cardiotônicos. A eficácia terapêutica desses glicosídeos no tratamento da insuficiência cardíaca e de certas arritmias supraventriculares é bem estabelecida sendo que a eficácia deste tratamento foi confirmada definitivamente em dois estudos multicêntricos (*N. Engl. J. Med.* 329: 1-7, 1993; *J.A.C.C.* 22: 955-962, 1993). Contudo estes fármacos possuem um baixo índice terapêutico, o que tem limitado sua utilização. O músculo cardíaco possui três isoformas da subunidade α da Na⁺/K⁺-ATPase, sendo que a isoforma α_1 é ubíqua e a isoforma α_3 , neuronal, estaria localizada no tecido de condução. Não se sabe ainda qual isoforma (α_1 e/ou α_2) seria o principal alvo do efeito inotrópico dos “digitálicos”. Desta forma, a descoberta de moléculas que permitam uma maior diferenciação entre estas isoformas poderia levar a fármacos com maior índice terapêutico (*Progr. Drug Res.* 47: 9-52, 1996). Tal molécula seria também altamente desejada ao nível da pesquisa básica para poder inibir seletivamente uma das isoformas e assim estudar sua contribuição na homeostasia celular.

Para tanto, utilizamos preparações de rim (α_1) e cérebro (α_2 e α_3) de rato nos nossos ensaios de screening.

Glicina (GLYT1b humano): captação de [³H]-glicina

Número de catálogo: T1

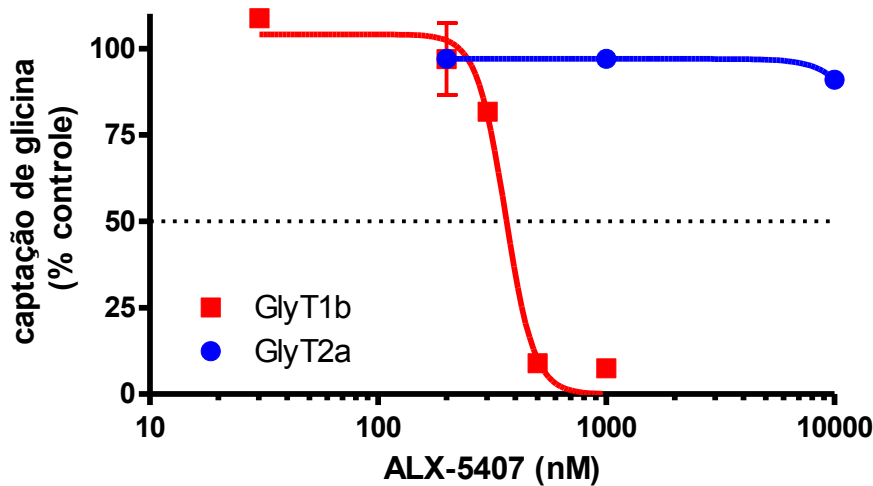
Código de preço:

Tecido: Células HEK-293 transfectadas com cDNA da isoforma 1b do transportador de glicina humano (hGLYT1b)

Glicina: [³H]L-glicina 10 μM em tampão HBS (15 min pré-incubação com inibidor e 5 min de captação)

Controle Positivo: ALX-5407 (NFPS), inibidor seletivo de GlyT1

Referência: Alberati et al (Neuropharmacol. 62: 11152-1161, 2012)



Relevância:

Dependência à drogas: Estudos em ratos demonstraram que dois inibidores seletivos da GLYT1, Org 25935 e Org 24598, são eficazes na redução do consumo compulsivo de álcool, efeito que pode ser atribuído à ativação de receptores glicinérgicos inibitórios no *nucleus accumbens* (Harvey & Yee, 2013).

Esquizofrenia: A bitopertina, inibidor seletivo de GLYT1, é um protótipo em fase clínica III (Roche®) para tratamento de sintomas negativos e déficits cognitivos na esquizofrenia (Umbricht e cols., 2014).

Aorta de rato: atividade contraturante ou relaxante

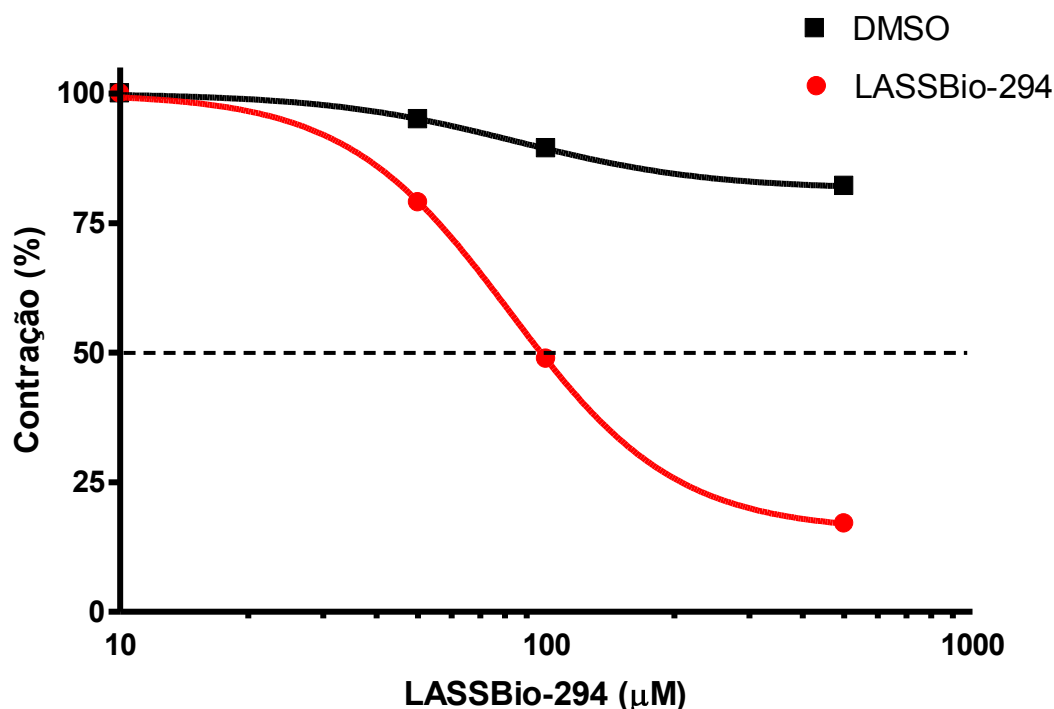
Número de catálogo: F1

Código de preço:

Tecido: aorta de rato (anéis)

Controle Positivo: agente contraturante: noradrenalina (1 μM); agente relaxante endotélio-dependente: acetilcolina (1 μM)

Referência: Silva et al., Br. J. Pharmacol. 135: 293-298, 2002



Relevância:

O objetivo deste ensaio é de avaliar a capacidade de uma substância em contrair ou relaxar o músculo liso vascular.

1. Substâncias que relaxam o músculo liso vascular podem ter utilidade terapêutica como vasodilatadores em patologias como hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, por si só ou em associação com um efeito cardíaco.
2. Outrossim, uma ação relaxante direta na aorta pode também se acompanhar de uma ação relaxante em outros músculos lisos, não-vasculares, e assim abrir o campo de possíveis aplicações terapêuticas.

Rato: pressão intra-uretral

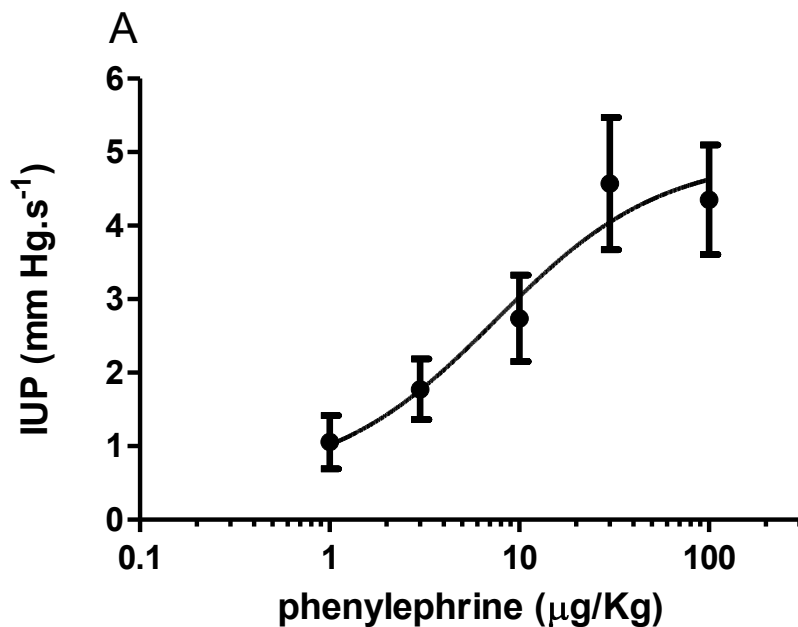
Número de catálogo: V1

Código de preço:

Éspecie: rato Wistar

Controle Positivo: agente contratante: fenilefrina (i.v.)

Referência: Chagas-Silva et al., (Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2014) 387:225–234); Nascimento-Viana et al., (submetido)



Relevância:

O objetivo deste ensaio é de avaliar a capacidade de uma substância bloquear o efeito da fenilefrina em aumentar a pressão intra-uretral. Este teste funcional serve na avaliação de antagonistas α -adrenérgicos candidatos a fármacos úteis no tratamento da hiperplasia prostática benigna, que tem como alvo os receptores α_{1A} (e α_{1D}) -adrenérgicos presentes da próstata e colo da bexiga.

4. MANUSEIO DAS SUBSTÂNCIAS

Conservação: em geladeira, com possibilidade de ser protegida da luz, caso for necessário.

Solubilidade: As substâncias são dissolvidas de acordo com informações solicitadas ao fornecedor da substância. Caso não haja informação, o solvente padrão é o DMSO, podendo ser experimentado o etanol e a água.

Controles: controles para os efeitos do solvente são realizados, na maior concentração do solvente a ser usada no teste.

- Em cada experimento são incluídos tubos controle (ligação total e não específico), sempre feitos em triplicata.
- Sob pedido, pode-se incluir no ensaio um dos compostos padrões usados para validação do ensaio.

Entrega das substâncias

Quantidade: no mínimo 5 mg (pré-pesado, com peso preciso indicado pelo fornecedor / receptor). Caso houver solicitação de ensaio em mais de um receptor e o composto estiver estável em solução estoque (geralmente DMSO 100%, em geladeira), pode-se racionalizar o uso da substância de tal forma que a quantidade necessária não cresce linearmente em função do número de receptores a serem testados.

Informações necessárias (*: indispensáveis):

- peso molecular*
- solubilidade*: DMSO 100% é o nosso padrão, caso não houver informação do solicitante (H₂O e ETOH são também possíveis).
- estabilidade
- sensibilidade à luz

5. PROTÓCOLOS BÁSICOS

Concentrações: Para os testes de “Receptores” e “Enzimas”, recomenda-se o teste de 5 concentrações, em triplicata. As concentrações a serem usadas são escolhidas pelo fornecedor da substância a ser testada (podemos auxiliar na escolha das concentrações, sob demanda).

Estratégia proposta (padrão para screening - BINDING):

- Realizar os ensaios em duplicata (2 tubos / condição experimental, como na firma especializada CEREP), para limitar os custos. Nota-se que as condições controles de ligação total e ligação não-específica (não cobrados) são sempre feitos em triplicata.
- Iniciar com uma avaliação preliminar de cada composto, com apenas duas concentrações (1 e 30 μM), sempre em duplicata:
 - . Caso não houver pelo menos 50% de inibição da ligação do radioligante na concentração de 30 μM , limita-se assim o custo a 4 tubos por composto.
 - . Caso houver inibição muito alta na concentração de 30 μM , já temos um dado em concentração 30 vezes menor, para melhor direcionar a segunda etapa visando a obtenção do valor de CI_{50}
- Fazer uma segunda avaliação, com pelo menos 3 concentrações diferentes daquelas de *screening*, visando a obtenção de curva de competição mínima para estimativa do valor de CI_{50} (5 concentrações em torno do CI_{50}).

6. EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS E RESPONSABILIDADE TÉCNICA

- A execução dos ensaios é realizada por técnico, ou aluno de Pós-graduação, especialmente treinados pelo docente responsável.
- O relatório é preparado pelo técnico responsável pelo ensaio e revisado pelo docente responsável pelo Setor de *Screening*, Prof. François Noël.

7. ENTREGA DOS RESULTADOS

Prazo padrão: 4 semanas após recebimento das substâncias

Meio: via Internet

Formato:

- Primeira opção: arquivo do GraphPad PRISM (caso o cliente tiver este software), com planilha de dados (média de % inibição para cada concentração da substância), figura (padrão igual ou semelhante àquele mostrado no portfolio) e resultado do cálculo estimativo do CI₅₀ (ajuste por regressão não linear), com informação sobre a qualidade do ajuste.
- Segunda opção: figura e resultado, colados em arquivo Word.
- Indicação do K_d para o ligante (calculado através de curva de saturação nas nossas condições experimentais) e valor de K_i do competidor, calculado através da equação de Cheng-Prusoff:

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

onde:

CI₅₀ = concentração do agente competidor na qual se obtém 50% de inibição da ligação do radioligante

K_i = constante de dissociação do agente competidor (= K_d, só que obtido através de ensaio de competição e não de saturação)

[L] = concentração do radioligante no ensaio

K_d = constante de dissociação do ligante (obtido por ensaio de saturação / "Scatchard")

6. PREÇOS OU CONDIÇÕES DE COLABORAÇÃO

O serviço deste *Setor de Screening* pode funcionar sob a forma de contrato de serviço (onde há o pagamento para o serviço, com emissão de nota fiscal via Fundação Educacional Charles Darwin, sem participação em eventual patente e/ou publicação científica) ou sob a forma de colaboração científica, com participação aos frutos eventuais, que seja na forma de patente ou de publicação científica.

Este serviço é devidamente registrado no ICB-UFRJ como projeto de extensão (*categoria: prestação de serviço especializado*), tendo sido aprovado em reunião da congregação do ICB/UFRJ (04/02/2009).

8. INSTALAÇÕES

Os ensaios de radioligação (*binding*) são realizados em local e com rotina devidamente registrados junto à CNEN (matrícula 12740, licença válida até 17/06/2016), na sala J1-22 do bloco J do CCS-UFRJ, recentemente reformada (vide fotos abaixo), sob a responsabilidade de profissional (Prof. François G. Noël) registrado na CNEN para o uso de radioisótopos na área de Aplicação em Pesquisa (licença AP-0371, válida até 03/12/2015).

A infraestrutura conta com 2 banhos-maria, 6 unidades de filtração (Hoeffler), 2 bombas de vácuo, um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 2810TR), além da infraestrutura necessária para o armazenamento e eliminação dos produtos radioativos (capela, pia profunda, geladeira, freezer, lixeiras e caixas de acrílico, todos devidamente identificados) assim como dos métodos de radioproteção (contador Geiger, luvas, óculos...).

