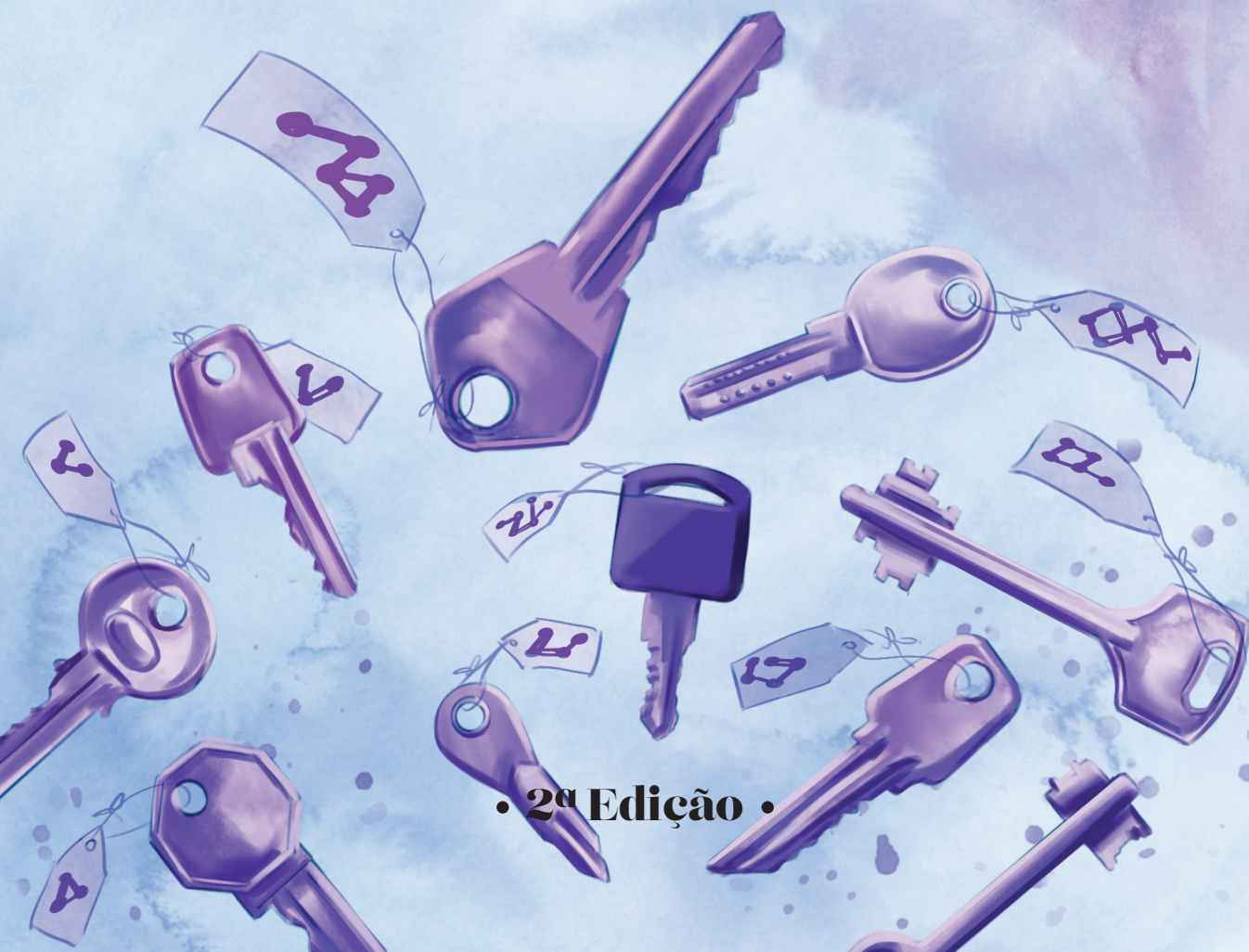


François Germain Noël

Ensaaios de *Binding:*

Fundamentos teóricos,
aspectos práticos e aplicações
na descoberta de fármacos



• 2ª Edição •

Ensaaios de *Binding*:

**Fundamentos teóricos, aspectos práticos e
aplicações na descoberta de fármacos**

François Germain Noël

Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ilustrado por Sarang

2ª Edição

Ed. do autor

Rio de Janeiro

2022

N765

Noël, François Germain.

Ensaio de binding [recurso eletrônico]: fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações na descoberta de fármacos / François Germain Noël; ilustração de Sarang. – 2.ed. – Rio de Janeiro: Ed. do autor, 2022.

3,85 Mb: il.

Formato: PDF

Requisitos: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui Bibliografia

ISBN: 978-65-00-55755-8 (recurso eletrônico)

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

CDD 615

Sumário

| | |
|---|------------------|
| Prefácios | <u>9</u> |
| 2ª edição | <u>9</u> |
| 1ª edição | <u>12</u> |
| Agradecimentos | <u>18</u> |
| Apresentação | <u>19</u> |
| Capítulo 1 - Interação Fármaco-receptor | <u>25</u> |
| 1.1. Modelo e parâmetros que caracterizam a ligação de um fármaco ao receptor e a produção de efeito | <u>26</u> |
| 1.2. Técnica de <i>binding</i> : aspectos históricos | <u>29</u> |
| Capítulo 2 - O papel dos ensaios de <i>binding</i> (alvo-dirigido) no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos | <u>34</u> |
| 2.1. Introdução | <u>35</u> |
| 2.2. Ensaio alvo-dirigido ou fenotípico? | <u>37</u> |
| Capítulo 3 - Metodologias para avaliação do complexo fármaco-receptor | <u>40</u> |
| 3.1. Técnicas baseadas em métodos fluorescentes | <u>42</u> |
| 3.1.1. Medida direta de fluorescência | <u>42</u> |
| 3.1.2. Transferência de Energia por Ressonância | <u>42</u> |
| 3.2. Métodos biofísicos | <u>43</u> |
| 3.2.1. Ressonância plasmônica de superfície | <u>44</u> |
| 3.2.2. Calorimetria de titulação isotérmica | <u>44</u> |
| 3.2.3. Termoforese em microescala | <u>45</u> |
| 3.2.4. Microscopia eletrônica em temperaturas criogênicas | <u>46</u> |

| | |
|---|------------------|
| Capítulo 4 - Ensaio de ligação direto | <u>47</u> |
| 4.1. Introdução | <u>48</u> |
| 4.2. Aspectos práticos | <u>48</u> |
| 4.2.1. O radioligante | <u>48</u> |
| 4.2.2. Fonte do receptor | <u>49</u> |
| 4.2.3. Meio e condições de incubação | <u>50</u> |
| 4.2.4. Separação do radioligante ligado e livre (<i>Bound – Free</i>) | <u>52</u> |
| 4.2.5. Determinação da ligação inespecífica (“não específica”) | <u>53</u> |
| 4.2.5.1. Conceito | <u>53</u> |
| 4.2.5.2. Natureza da ligação inespecífica (NS) | <u>55</u> |
| 4.2.5.3. Lavagem e uso de antiadsorventes | <u>55</u> |
| 4.2.6. Determinação da quantidade de proteína | <u>55</u> |
| 4.3. Ensaio de saturação no equilíbrio | <u>56</u> |
| 4.3.1. Curva de saturação simples (uma população homogênea de sítios de ligação): representação gráfica e análise | <u>58</u> |
| 4.3.2. Curvas de saturação atípicas (gráficos de Scatchard não lineares) | <u>60</u> |
| 4.3.2.1. Gráficos de Scatchard côncavos | <u>60</u> |
| 4.3.2.2. Gráficos de Scatchard convexos | <u>62</u> |
| 4.4. Ensaio cinéticos: k_{+1} e k_{-1} | <u>63</u> |
| 4.4.1. Reações bimoleculares simples (uma população de sítios de ligação) | <u>63</u> |
| 4.4.1.1. Cinética de associação | <u>63</u> |
| 4.4.1.2. Ensaio de dissociação | <u>65</u> |
| 4.4.2. Curvas de dissociação atípicas | <u>66</u> |
| 4.4.2.1. Multiplicidade de sítios de ligação | <u>66</u> |
| 4.4.2.2. Cooperatividade | <u>67</u> |
| 4.5. Aplicações | <u>68</u> |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.1. Descoberta de fármacos: avaliação do mecanismo de ação molecular de novos protótipos (<i>lead compounds</i>) | <u>68</u> |
| 4.5.2. Avaliação de alterações de afinidade e/ou número de receptores: estudo em doenças, ontogenia e envelhecimento ou distribuição no organismo. | <u>68</u> |

Capítulo 5 - Ensaio de ligação indireto (com substâncias teste não marcadas) 71

| | |
|--|-----------|
| 5.1. Introdução | <u>72</u> |
| 5.2. Ensaio de competição no Equilíbrio: Determinação de K_i | <u>72</u> |
| 5.2.1. Fundamentos teóricos | <u>72</u> |
| 5.2.2. Aspectos práticos | <u>75</u> |
| 5.2.2.1. Tempo para alcançar o equilíbrio na presença de competidor..... | <u>75</u> |
| 5.2.2.2. Curvas atípicas e coeficiente de Hill | <u>76</u> |
| 5.2.3. Aplicações | <u>78</u> |
| 5.2.3.1. Descoberta e desenvolvimento de fármacos | <u>78</u> |
| 5.2.3.1.1. <i>Screening</i> | <u>78</u> |
| 5.2.3.1.2. Relação Estrutura-Atividade (REA) | <u>79</u> |
| 5.2.3.1.3. Validação de modelos de <i>docking</i> para triagem virtual | <u>79</u> |
| 5.2.3.1.4. Avaliação de seletividade | <u>80</u> |
| 5.2.3.2. Mecanismo molecular de ação: reversibilidade da ligação | <u>81</u> |
| 5.3. Ensaio de cinética: Determinação do tempo de residência | <u>83</u> |
| 5.3.1. Fundamentos teóricos | <u>83</u> |
| 5.3.2. Aspectos práticos | <u>84</u> |
| 5.3.3. Aplicações | <u>90</u> |
| 5.3.3.1. Descoberta de novos fármacos | <u>90</u> |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 6 - Ensaios menos clássicos e aplicações | 92 |
| 6.1. Eficácia Intrínseca (<i>Binding</i> funcional) | 93 |
| 6.1.1. GPCRs – Receptores acoplados à proteína G | 93 |
| 6.1.1.1. Princípio | 93 |
| 6.1.1.2. GTP- <i>shift</i> | 94 |
| 6.1.1.3. Razão de K_i | 95 |
| 6.1.1.4. <i>Binding</i> de [^{35}S]- GTP γ S | 97 |
| 6.1.1.5. Na $^{+}$ - <i>shift</i> | 98 |
| 6.1.2. Receptores ionotrópicos | 100 |
| 6.1.2.1. Receptor benzodiazepínico e GABA- <i>shift</i> | 101 |
| 6.2. Alostерismo | 101 |
| 6.2.1. Fundamento teórico | 101 |
| 6.2.2. Aspecto prático | 102 |
| 6.2.2.1. Tipos de ensaio | 102 |
| 6.2.2.2. Escolha do radioligante e da fonte de receptor (espécie) | 104 |
| 6.3. Determinantes Termodinâmicos da afinidade: ΔH e ΔS | 107 |
| 6.3.1. Princípio | 107 |
| 6.3.2. Aspecto prático | 108 |
| 6.3.3. Aplicações | 110 |
| 6.3.3.1. Descoberta de fármacos | 110 |
| 6.3.3.2. Discriminação termodinâmica | 110 |
| 6.4. Caracterização farmacológica de receptores ortólogos | 110 |
| 6.4.1. Princípio | 110 |
| 6.4.2. Aspecto prático | 111 |
| 6.4.3. Aplicações | 111 |

Capítulo 7 - Regressão não linear e ajuste de curvas ... 114

7.1. Ajuste de curvas: Princípio 115

7.2. Equação linear e regressão linear..... 116

7.3. Equação não linear 116

7.3.1. Linearização dos dados e regressão linear 116

7.3.2. Regressão não linear 117

7.3.2.1. Regras de boas práticas para ajuste de
curvas concentração-efeito 117

7.3.2.2. Qualidade do ajuste 118

Capítulo 8 - Análise estatística e apresentação dos parâmetros 123

8.1. E_{\max} , B_{\max} 124

8.2. K_d , K_i , CE_{50} , CI_{50} 125

Capítulo 9 - Portfólio de ensaios do LBFM 127

9.1. Introdução..... 128

9.2. Acessibilidade 129

9.3. Catálogo de Ensaios e exemplo 129

Capítulo 10 - Referências 132

Autores 146

Autor 146

Ilustradora 147

1 Prefácio

Setembro de 2022

Há poucas décadas se criou na comunidade científica a consciência de que devemos ampliar o nosso raio de comunicação. Sim, os cientistas começaram a se conscientizar de que não basta escreverem para o seu círculo de especialistas, como se fazia no século XX. Nessa época, um primeiro círculo de raio exíguo bastava aos cientistas para a comunicação que esperavam sobre seu trabalho. Escrevíamos em jargão técnico, publicávamos nossos experimentos e resultados em revistas especializadas, e isso nos satisfazia plenamente. Também às agências de financiamento bastava investigar quantos trabalhos tínhamos publicado, em quais revistas e suas métricas de qualidade. Ficávamos dentro de nosso próprio, restrito, círculo de especialistas.

A transversalidade da Ciência se acentuou, e a necessidade de sensibilizar um novo círculo de raio maior ficou premente. Os farmacologistas precisavam conversar com os biólogos moleculares e, além disso, na outra direção, com os inovadores e os industriais. Um novo e maior círculo concêntrico se formou em torno de cada um de nós, resultado da necessidade criada pela multidisciplinaridade.

A partir do século XXI, ficou claro e cristalino que as crianças e os jovens também precisavam conhecer a ciência já na escola, com suficiente detalhe que lhes permitisse compreender as realidades do mundo que deviam apreender. Um novo e ainda mais amplo círculo se criou em torno dos cientistas, porque precisaram agora conversar com os professores e seus alunos – a divulgação científica entrou na escola, e ampliou o alcance do conhecimento científico. Era a oportunidade de capturarmos jovens corações e mentes para as profissões baseadas na Ciência, cada vez mais numerosas. Também tornou-se necessário atrair meninos e meninas para a profissão de cientista, já não mais vestida de fantasia – homens apenas, geralmente excêntricos e descabelados.

Por fim, a pandemia nos invadiu e escancarou a inadiável importância de obter o apoio de amplos setores da população, em todas as classes

sociais, de todas as profissões, homens e mulheres, meninos e meninas. Foi o último círculo que faltava, o maior deles. Ciência para todos.

Essa trajetória nos obrigou a navegar de um círculo a outro, buscando adaptar a linguagem, usar mídias digitais, jogos virtuais, ilustrações artísticas refinadas, música e diversão. Cada um de nós, em sua especialidade, busca agora ampliar o seu círculo, revelando a mais e mais cidadãos o encanto e a importância da Ciência.

Valorosa expressão dessa evolução geracional na comunidade de cientistas, é este livro de François Noël, farmacologista de renome, especialista em *binding*... Épa, o que mesmo vem a ser *binding*? Caímos novamente no jargão, mas agora temos a ajuda do livro que os leitores estão prestes a degustar. Pelo que depreendi, agora enriquecido com ilustrações e vestido com uma diagramação de enorme bom gosto e delicadeza de autoria da jovem Aimêe (Sarang) Mothé, temos um livro renovado patrocinado novamente pela Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental.

Continua o movimento de ampliação dos círculos concêntricos em torno de nosso microuniverso do laboratório. Cada um de nós cientistas cresce de alcance e influência. O movimento de popularização e difusão da Ciência agora segue enriquecido com mais uma obra exemplar nesse caminho de ampliação de horizontes.

Roberto Lent

Professor Emérito do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ
Pesquisador do Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa

Prefácio

Outubro de 2022



A segunda edição do livro: **“Ensaio de Binding: Fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações na descoberta de fármacos”** escrito pelo Dr. François Noël, professor titular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, é uma jornada incrível pelo mundo da farmacologia quantitativa. Nessa segunda edição, o autor, com o auxílio de sua aluna de Iniciação Científica, Aimêe (Sarang) Mothé, traz uma inovação relativa à primeira versão, ou seja, ilustra de forma lúdica, as principais mensagens de cada capítulo. Essa mistura, de ciência e arte, deu um toque fantástico para o novo livro. É possível enxergar nitidamente, em cada parágrafo, a paixão do autor pela ciência dos receptores e a delicadeza da aluna na confecção das ilustrações.

O livro é de fácil leitura e consegue, de maneira didática, trazer aspectos conceituais/teóricos bem como aspectos práticos/experimentais da área de receptores farmacológicos. Ainda, demonstra as possibilidades de aplicação desses aspectos, tanto no que diz respeito à ciência básica, quanto nos eventos envolvidos na descoberta de novos fármacos. Essa conjugação de fatores faz com que esse livro seja de cabeceira para os farmacologistas, mas também seja, de leitura compulsória, para os pesquisadores de outras áreas que atuam na descoberta de fármacos. Tenho certeza que esse será, novamente, um grande sucesso.

Thiago Mattar Cunha

Professor Associado da USP-RP
Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacologia e
Terapêutica Experimental (SBFTE), Gestão 2021-2023



Prefácios da 1ª Edição

Prefácio

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 prêmio 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

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”*. Parabenizo o 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

Dedicatória e agradecimentos

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

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

Agradeço ao professor Luis Eduardo Menezes Quintas (ICB-UFRJ) pela cuidadosa revisão do texto e aos Doutores Roberto Lent (ICB-UFRJ) e Thiago Mattar Cunha (USP-RP) pelo prefácio desta nova edição e chancela da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE).

Agradeço aos professores **Cláudia Lúcia Martins da Silva** e **Luis Eduardo Menezes Quintas**, inicialmente colegas e atualmente amigos que me ajudaram a consolidar o Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular (LFBM).



Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial aos alunos listados abaixo que realizaram alguns dos experimentos de *binding* mencionados nos artigos citados neste e-book, assim como a todos os alunos que passaram pelo LFBM, por ter propiciado um rico e agradável convívio ao longo destes anos: Amanda Reis Pimenta, Anne Caroline Santos da Silva, Bruna Maria Castro Salomão Quaresma, Bruna Cunto de Moura, Carolina Drummond Maia de Figueiredo, Daniele Valentim de Souza Lopes, Dayde Lane Mendonça-Silva, Eliana Freitas do Ó, Elisa Suzana Carneiro Pôças, Fernando Monteiro do Monte, Gilda Angela Neves, Jean Pierre Barros Thibaut, Jéssica Barbosa Nascimento-Viana, Luciana B Lopez, Mariana Manzano Rendeiro, Pedro Azalim Neto, Renan de Oliveira Vieira, Rafaela Ribeiro Silva, Rosangela Souto Pardon, Thais Emanuelle Tavares Pompeu, Valéria do Monti Nascimento Cunha.

Agradeço ao CNPq (Bolsa de produtividade em pesquisa) e à FAPERJ (Cientista do Nosso Estado) pelos anos de apoio aos meus projetos de pesquisa que envolveram muitos estudos de *binding*.

Apresentação

“A ciência é a inteligência do mundo;
a arte, o seu coração”

Máximo Gorky



Apresentação

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.

Apaixonados por este tema, em 2017 decidimos tentar aproveitar nossa experiência, que era então 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, tínhamos optado por disponibilizar um texto em português na forma de e-book que podia ser baixado gratuitamente no site da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), com a chancela da mesma. Nota-se que esta publicação se tornou o primeiro marco do que seriam as “Iniciativas educacionais” da SBFTE, que deslancharam em 2021 e que contam agora com vasto material. Cinco anos após o lançamento deste e-book, achamos que era o momento de escrever uma segunda edição, atualizada e modernizada como ilustrado a seguir:

A atualização incluiu a ampliação de capítulos (e.g. 2 e 3) e inclusão de sete novas figuras (retiradas de artigos do nosso laboratório, publicados desde a primeira edição) e alteração de duas figuras, assim como a inclusão de 43 novas referências. Aumentamos também os links para matérias nossas do glossário semântico de farmacologia da SBFTE;

A modernização se deu graças à participação da nossa aluna de iniciação científica da Escola de Belas Artes da UFRJ, Aimêe (Sarang) Mothé,

que foi convidada para fazer uma paginação mais moderna do e-book e para ilustrar cada capítulo com desenhos originais, além da nova capa, na tentativa de aproximar Arte e Ciência. O resultado nos agradou muito, como era esperado após o belíssimo trabalho que Aimêe havia feito como responsável pelo design e arte do jogo de tabuleiro Screener, outra iniciativa educacional nossa chancelada pela SBFTE;

Quando Arte e Ciência se encontram...



À primeira vista parece difícil pensar em marcar um encontro entre Arte e Ciência, já que associamos Arte com subjetividade, criatividade e interpretação enquanto que a Ciência nos faz pensar em razão, método e objetividade, o que explica a “convenção” de tratar a arte com cores quentes e a ciência com cores frias. Porém, é só lembrar-se dos feitos de Leonardo Da Vinci (1452-1519), capaz de pintar a “Mona Lisa” e desenhar “O Homem Vitruviano” (1490), para realizar que já temos um ícone inegável para a integração entre Ciência e Arte. Até Albert Einstein (1879-1955), prêmio

Nobel (1905) reconhecido pelos seus trabalhos de física (ciência “dura”) nós deixou dicas de que atributos “artísticos” eram importantes em Ciência: “Eu sou suficientemente artista para me deixar levar pela imaginação”. Será que o ponto de interseção (encontro) entre estas duas faces da mente indivisa é justamente a imaginação, ou será a motivação, já que Arte e Ciência tem o mesmo desejo por descoberta e conhecimento novo? É interessante notar que Ciência e Arte se encontram também na música popular brasileira, como nestas letras da música “Quanta” (1955) de Gilberto Gil: “Sei que a arte é irmã da ciência ambas filhas de um Deus fugaz” ou ainda no samba “Ciência e Arte” (1948) de Cartola e Carlos Cachça: “Tu és meu Brasil em toda parte quer na ciência

ou na arte”. O futebol, outra paixão brasileira, nós fornece outros índices de possível encontro entre Arte e Ciência já que é comum ouvir falar que treinadores (frequentemente chamados de professores pelos atletas) “estudam” o adversário enquanto que jogadores que praticam a “arte” do drible são reverenciados pelos amantes do chamado futebol-arte.

Além das alterações acima, mantivemos o esquema original do livro para discutir aspectos essenciais, como 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, oferecemos exemplos tirados majoritariamente de artigos do nosso laboratório, e ilustramos o seu campo de aplicação com particular foco no processo de descoberta e desenvolvimento pré-clínico de novos candidatos a fármacos. Como na primeira edição, exploramos também aspectos gerais de farmacologia e áreas afins como representação gráfica de curvas concentração-efeito, sua análise por regressão não linear e aspectos estatísticos relacionados, esperando interessar um leque maior de cientistas e alunos.

Ao longo do texto, utilizamos a nomenclatura e formalismo recomendados pela IUPHAR (Neubig e cols., 2003) e pelas matérias do glossário semântico de farmacologia da SBFTE.

Esperando que esta segunda edição possa ser relevante para seus experimentos e/ou para a interpretação de artigos utilizando estas técnicas, ou mesmo pela rica discussão de aspectos fundamentais da relação entre concentração e efeito, de grande interesse em farmacologia e áreas afins, desejamos a todos uma boa leitura.

Rio de Janeiro, agosto 2022.
François Noël

Apresentação

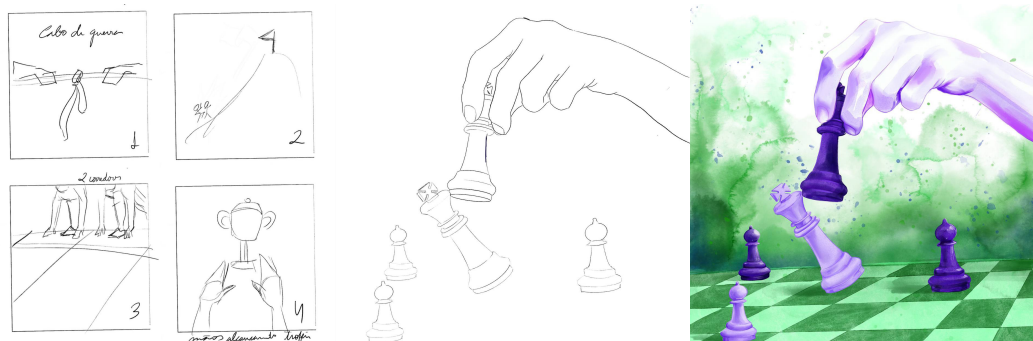
Primeiramente gostaria de dizer que foi uma honra trabalhar neste projeto com o professor François. Trabalhamos juntos no desenvolvimento do jogo de tabuleiro Screener, que foi um absoluto sucesso desde seu lançamento. Após 1 ano como bolsista, ele me convidou a fazer o projeto gráfico de uma nova edição comemorativa de seu livro *Ensaio de Binding: Fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos* e eu não poderia estar mais feliz com seu convite.

Começar um projeto do zero é sempre um pouco assustador, mas ao mesmo tempo intrigante, como uma nova aventura esperando por você. E foi assim que comecei a fazer pesquisas e a rascunhar ideias para este livro: com um frio na barriga e um sorriso no rosto.

Não sei se você, querido leitor, teve a oportunidade de estudar sobre o processo artístico, mas saiba que envolve bem menos inspiração divina e misticismo do que costumam contar por aí. Arte é improviso e sentimento, mas também é estudo e método. O gênio que nasceu com um chamado divino da arte e produz obras de arte sempre que toca no papel é um mito. Na verdade, a arte é estudo, como a ciência. E é para todos, independente de “dom”.

Para todos os projetos, a primeira etapa é a pesquisa. Buscar referências, inspirações e novas técnicas que queria aplicar. Nessa fase também acontece muita conversa com o cliente, no meu caso o François. Na verdade, essa comunicação é imprescindível em todo o processo para que o desenvolvimento do projeto flua sem problemas.

Após conversas sobre qual linha de ilustração seguir, optamos por representar de maneira visual e lúdica os conceitos tratados em cada capítulo. Nesse momento o François foi de extrema ajuda para explicar os assuntos de forma que uma leiga como eu pudesse entender. Sentamos juntos (de maneira virtual, claro) e conversamos sobre as várias abordagens que poderíamos seguir, e chegamos a esse estilo de aquarela.



Processo de uma das ilustrações: 1. Primeiras ideias para serem escolhidas, 2. Lineart da ilustração, 3. Arte final.

Em seguida, fiz várias opções de rascunhos para o François escolher para a capa de cada capítulo, e após isso eu fazia a arte seguindo o estilo e a paleta de cores do projeto gráfico. Algumas artes foram resolvidas em um dia, outras demoraram semanas para ficarem prontas. Nunca é uma fórmula exata, e essa é a magia da coisa.

No final, cada desenho é uma aventura em si.

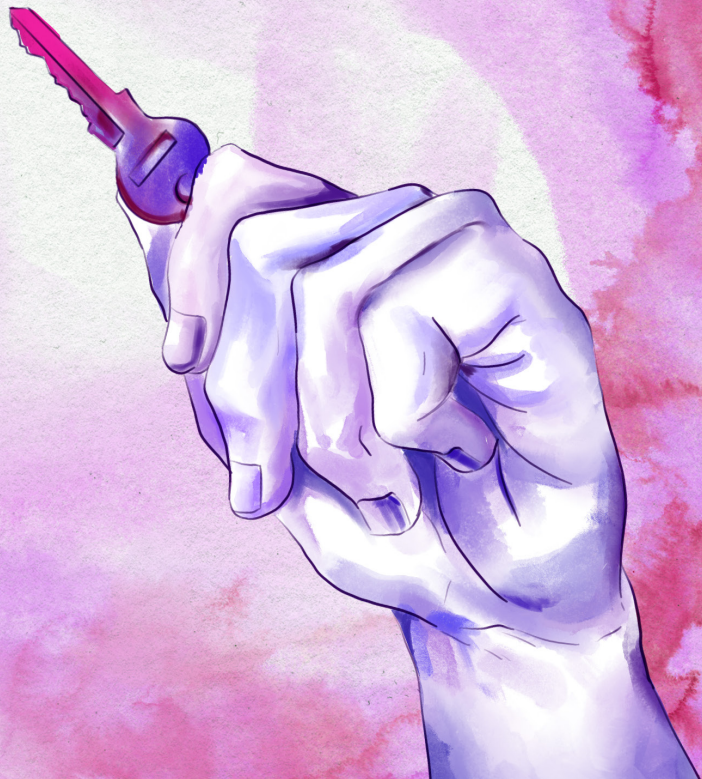
Rio de Janeiro, agosto 2022.
Aimêe (Sarang) Mothé

Capítulo 1

Interação Fármaco-receptor

“A imaginação é mais importante
que o conhecimento”

Albert Einstein



Capítulo 1

Interação fármaco-receptor

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, recomendamos 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; Kenakin, 2019).

1.1. Modelo e parâmetros que caracterizam a ligação de um fármaco ao receptor e a 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 Fármaco-Receptor (FR), geralmente obtida através de ensaio de *binding*, e a medida do efeito resultante (E), obtida em ensaio de farmacologia funcional, que chamaríamos 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 ($[R]_{\text{total}}$) 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, **Archibald V. 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 fármaco-receptor 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.

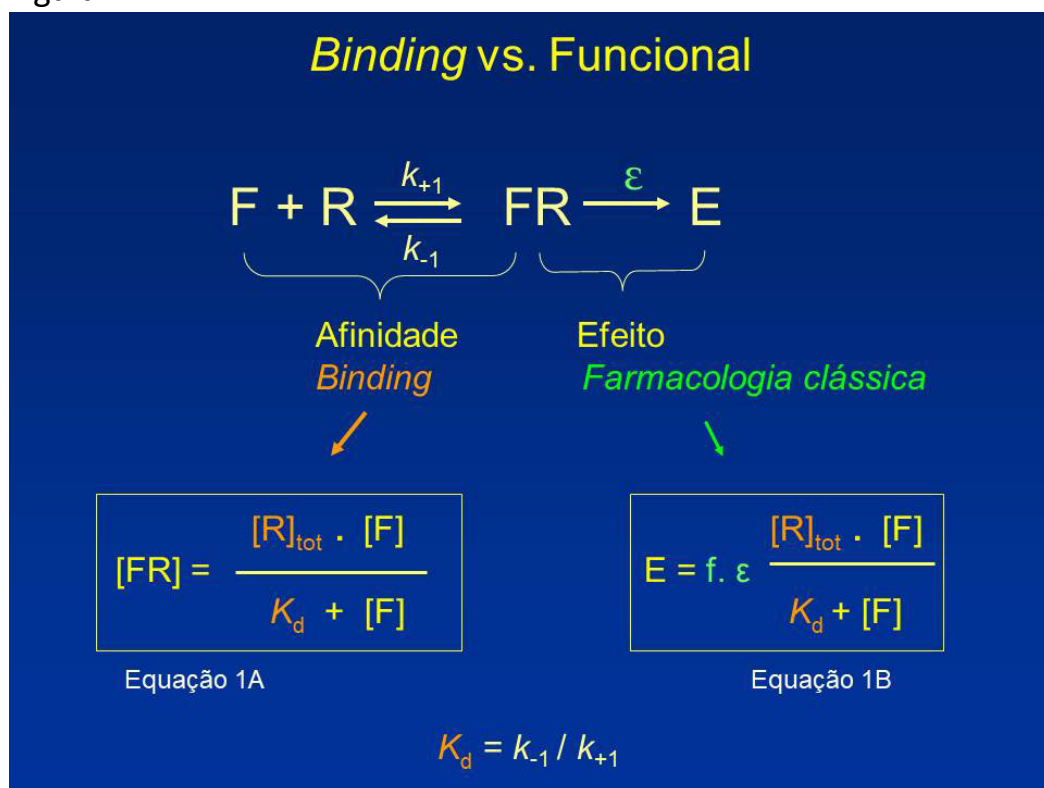
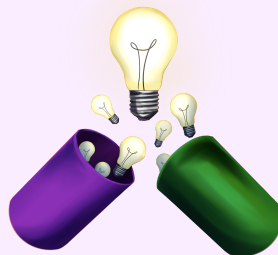


Figura 1. Esquema representando a formação de complexo entre um fármaco (F) e seu receptor (R), seguindo uma reação bimolecular simples, e a produção de efeito (E). O esquema enfatiza o desfecho dos estudos de *binding* (concentração de complexos fármaco-receptor formados) e de farmacologia clássica (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 Fármaco-Receptor ($[FR]$), 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 (K_d e ϵ) e dois são propriedades do sistema biológico ($[R]_{tot}$ e f)

Por outro lado, contrariamente ao que **Alfred J. 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 **John N. 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).



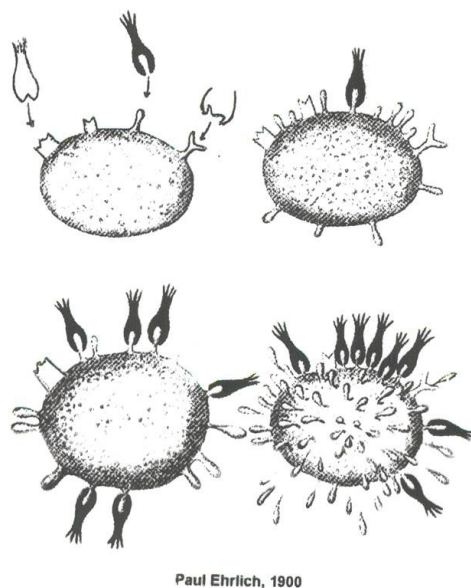
Dica 1. Agonistas. Na realidade, a situação é um pouco mais complicada, sobretudo para os agonistas. De fato, como explicado no **Capítulo 6.1.**, para o caso de receptores metabotrópicos (GPCR), a afinidade de agonistas medida em ensaio de *binding* será sempre aparente (“macroscópica”), pois é contaminada 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 intrínseca (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), a partir de um conjunto de conformações pré-existentes diferentes mas similares em termos de energia livre (Kenakin, 2019).

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 podemos 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).

Apesar desta figura ter sido inicialmente introduzida em 1899 para explicar um mecanismo de depuração de substâncias tóxicas



Paul Ehrlich, 1900

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

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

(lembramos que Ehrlich foi laureado com 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 membranar e saturabilidade. De fato, após ter inicialmente relutado à ideia de receptor farmacológico introduzida por **John N. Langley** desde 1875, Ehrlich aplicou depois seu conceito de “quimiorreceptores” para fármacos (1917), o que o levou à descoberta da arsfenamina (Salvarsan®), primeiro quimioterápico para o tratamento da sífilis, razão pela qual é reverenciado até hoje como o “Pai da Quimioterapia” (Noël, 2020). 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 [^{14}C]-decametônio em diafragma de camundongo (Fig. 3).

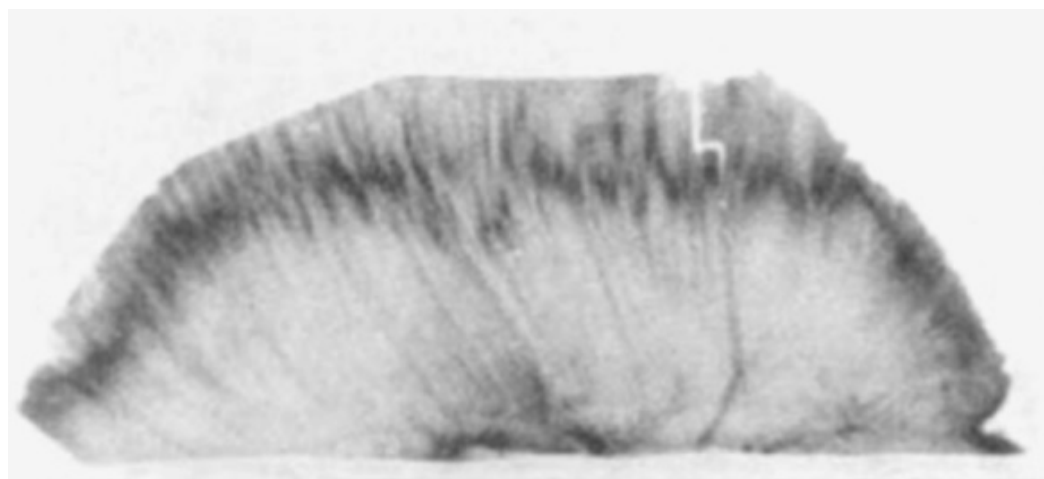


Figura 3. Autorradiografia de diafragma de camundongo com [^{14}C]-decametônio (Luthi & Waser, 1956). Reimpresso com permissão da Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, direitos autorais 1956 (<http://www.nature.com/nature/index.html>).

Dez anos depois, **William D.M. Paton** e **Humphrey P. 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.

A abordagem de lavagem rápida e filtragem adotada por **Solomon H. Snyder** provou ser o avanço técnico necessário para demonstrar conclusivamente a existência de receptores específicos para opiáceos no sistema nervoso central (Pert & Snyder, 1973). Snyder desenvolveu a seguir ensaios de radioligação para todos os principais receptores de neurotransmissores no cérebro. Um ano depois a ligação do $[^3\text{H}]$ -alprenolol ao receptor β -adrenérgico foi reportada em fração membrana de eritrócitos de sapo (Fig.4) por **Robert J. Lefkowitz** (Lefkowitz e cols., 1974) cuja contribuição para o estudo dos receptores adrenérgicos foi recompensada pelo prêmio Nobel de Química em 2012. Em meados desta década, foram estabelecidos 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.**)

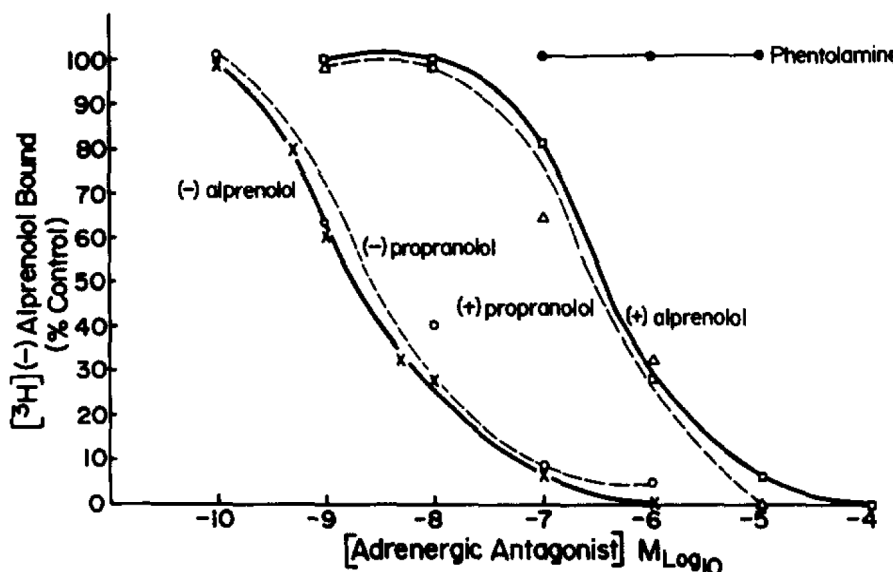


Figura 4. Inibição da ligação de $(^3\text{H})(-)\text{-alprenolol}$ por antagonistas. Retirado de Lefkowitz e cols., 1974.

Essa nova metodologia foi empregada para tratar de questões importantes em farmacologia, como isolamento e caracterização de receptores, alterações em receptores de neurotransmissores associadas ao desenvolvimento do cérebro, tratamento farmacológico e transtornos neurológicos e psiquiátricos, quantificação dos níveis de fármacos e neurotransmissores em tecidos e fluidos biológicos (Bylund & Enna, 2018).

Nos anos 1990, apareceram técnicas para avaliação da interação fármaco-receptor sem a necessidade de marcação do ligante (*label-free*), como a ressonância plasmônica de superfície (vide [capítulo 3](#).) Em 2006, Copeland e colaboradores chamaram a atenção sobre a importância que poderia ter o tempo de residência do fármaco no alvo, e não somente a sua afinidade, para explicar o seu efeito. Este aspecto cinético é geralmente avaliado pela técnica de *binding* e será abordado no [capítulo 5.3](#). Outro aspecto importante a destacar foi o advento da biologia estrutural no processo de descoberto de fármacos. Graças à cristalografia de raios X foi possível fornecer informações estruturais extremamente abrangentes sobre a interação de um ligante com um alvo farmacológico (Maveyraud & Mourey, 2020). Este avanço tecnológico abriu uma avenida para a avaliação *in silico* da potencialidade de ligação de uma substância a um receptor como através da técnica de *docking*, cada vez mais empregada nas etapas iniciais do processo de seleção de novas substâncias potencialmente ativas. Um momento histórico que podemos destacar nesta caminhada foi a obtenção de cristal de um complexo formado pelo receptor β_2 adrenérgico e pela proteína Gs, pelo grupo de [Brian K. Kobilka](#) recebedor do prêmio Nobel de Química em 2012 junto com Lefkowitz (Rasmussen e cols., 2011), o que ajudou no entendimento da relação entre *binding* e ativação de um receptor.

A figura 5 apresenta de forma resumida e visual algumas das descobertas que consideramos importantes para o conceito da interação fármaco-receptor e a técnica de *binding*.

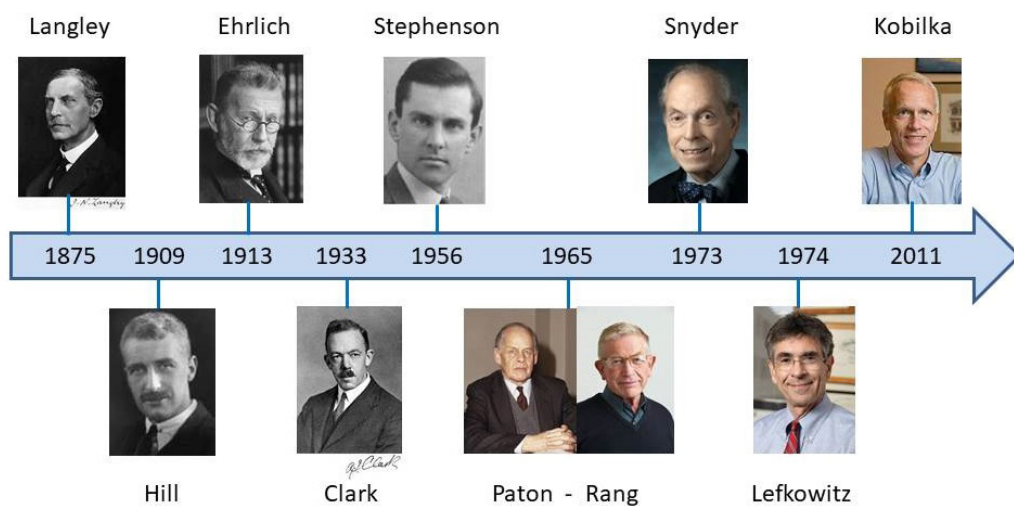


Figura 5. Linha do tempo: pesquisadores com grande contribuição para o estudo dos receptores e os ensaios de *binding*.

Capítulo 2

O papel dos ensaios de *binding* (alvo-dirigido) no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

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

Winston Churchill



Capítulo 2

O papel dos ensaios de *binding* (alvo-dirigido) no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

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; Kenakin, 2019).

2.1. Introdução

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos que culmina com a aprovação de um novo medicamento pela agência reguladora é demorado e caro, já que leva em média 11-13 anos e custa em torno de 0,9-1,8 bilhões de dólares (Paul e cols., 2010; Haber & Spaventi, 2017), com uma probabilidade de sucesso muito pequena, estimada em uma substância aprovada para cada 10.000 – 100.000 substâncias iniciais. Este processo multidisciplinar pode ser didaticamente dividido em duas fases: **uma de Descoberta e outra de Desenvolvimento** (Paul e cols., 2010; Blass, 2015), claramente separadas pela eleição do candidato a fármaco (Blass, 2015), para o qual é solicitada uma autorização para iniciar os estudos clínicos junto à agência reguladora.

De forma didática, o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos pode ser dividido em sete etapas representadas na figura 6. Utilizando-se de modelos de complexidade crescente (*in silico*, *in vitro* e, depois, *in vivo*, em animais de laboratório e seres humanos voluntários), são averiguadas e aperfeiçoadas características essenciais de eficácia e segurança, assim como farmacocinéticas e farmacêuticas (Noël & Xexéo, 2021; Noël e cols., 2021).



Figura 6. Mapa do processo de Descoberta e Desenvolvimento de Fármacos, indicando as 7 etapas consideradas no jogo educacional Screener. Retirado de Noël & Xexéo, 2021

A descoberta de novos fármacos inicia-se na avaliação da atividade biológica de novas substâncias, quer sejam sintéticas ou de origem natural (Haber & Spaventi, 2017). 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 um grande número de substâncias para “filtrar” **substâncias ativas, ou “hits”**, como são chamadas em inglês (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 (**estratégia 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*, screening de alta vazão ou rendimento), quando foi pressionada pela velocidade com a qual novas substâncias eram sintetizadas através da química combinatória ou disponibilizadas em quimiotecas cada vez mais numerosas e ricas em quantidade de substâncias.

Além de serem importantes para seleção de **hits (substâncias com ativi-**

dade 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 **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 descoberta de novos fármacos (**Capítulo 5.3.**).

2.2. Ensaio alvo-dirigido ou fenotípico?

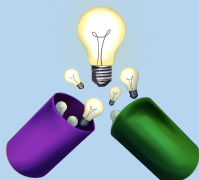
Embora os ensaios de ligação ao receptor ainda sejam amplamente usados no processo de descoberta de fármacos, muitos autores consideram que o valor preditivo de tais dados por si só é limitado no que diz respeito à utilidade clínica. Se contrapondo à estratégia baseada no alvo molecular, a estratégia fenotípica visa a geração de protótipos de forma empírica e agnóstica em relação ao alvo para identificar moléculas farmacologicamente ativas que funcionam por meio de mecanismos novos. Apesar do uso cada vez mais frequente de ensaios baseados em células para *screening* de novas **substâncias ativas (hits)** na indústria farmacêutica (Williams & Sewing, 2005), dados 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). A mesma constatação vale para a descoberta de fármacos com novo mecanismo de ação (*first-in-class*) (Eder e cols., 2014), apesar de trabalho anterior muito citado indicando superioridade da estratégia fenotípica (Swinney & Anthony, 2011). Desta forma, é importante prestar atenção no ensinamento do “mago”

James W. Black (2010) quando se quer comparar a valia dos diferentes tipos de ensaios a serem usados no processo de descoberta de fármacos, com avaliações indo do nível molecular (*binding*) ao animal, passando pelos ensaios fenotípicos baseados em células: *“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”*. Mesmo quando se opta pelo uso de ensaio fenotípico para *screening*, uma vez selecionado um novo **protótipo**, sempre haverá necessidade de definir seu alvo molecular, podendo ser usada a técnica de *binding* para elucidar o mecanismo molecular e não mais como ferramenta para seleção de *hits* (Haber & Spaventi, 2017).

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 da substância (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, sendo cada vez mais empregadas células humanas (Berg, 2021). Além dos desafios em desenvolver mais ensaios relevantes em termos de doença e de órgãos (Berg, 2021), é necessário 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 ainda 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*. Apesar destes desafios, o uso da estratégia fenotípica cresceu de uma estimativa de <10% para 25–40% do portfólio de projetos de algumas empresas (Swinney & Lee, 2020).

Podemos concluir que o ensaio de ligação é mais útil para a desco-

berta de fármacos quando é usada em conjunto com ensaios fenotípicos funcionais. Assim, o ensaio de radioligação deve permanecer uma ferramenta indispensável para a descoberta de fármacos e para caracterizar o local e o mecanismo de ação (Bylund & Enna, 2018).



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).

3 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



Metodologias para avaliação do complexo fármaco-receptor

O planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, acrônimo do inglês *Structure Based Drug Design*) começou na década de 1980, quando ambas a cristalografia de raios X (vide cap.1) e a modelagem molecular foram introduzidas pela primeira vez na descoberta de fármacos; na década de 1990, a SBDD havia se tornado uma abordagem usada rotineiramente. O primeiro grande sucesso da SBDD foi a descoberta de inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV, acrônimo do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) contra a AIDS, como o indinavir, da Merck Sharp & Dohme (MSD) (Ravina, 2011). Métodos *in silico* baseados na estrutura do receptor, quer seja cristalográfica ou determinada por homologia, são cada vez mais bem aceitos nas primeiras etapas de projetos de descoberta de fármacos para planejar racionalmente novos ligantes ou mesmo “filtrar” quimiotecas, físicas ou virtuais (Maveyraud & Mourey, 2020). Além de fornecer informações precisas sobre a interação de um ligante com seu alvo farmacológico, a cristalografia de raios X permite rastrear uma biblioteca inteira de fragmentos graças a sua sensibilidade para detectar ligantes de baixa afinidade. Nota-se que 25 anos após seu primeiro emprego, esta estratégia de descoberta baseada em fragmentos (*fragment-based drug discovery*) é cada vez mais usada (Erlanson e cols., 2016; Maveyraud & Mourey, 2020).

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, combinada ou não com transferência de energia de ressonância por fluorescência ou bioluminescência (Stoddart e cols., 2016).

3.1. Técnicas baseadas em métodos fluorescentes

3.1.1. Medida direta de fluorescência

Alguns dos primeiros casos de uso de ligantes fluorescentes para monitorar a ligação a receptores usaram anisotropia de fluorescência, também referida como polarização de fluorescência, já que a fixação da molécula ao receptor altera a polarização da fluorescência (Stoddart e cols., 2016). Nesta técnica, há introdução de uma sonda fluorescente na estrutura da pequena molécula ligante de interesse, geralmente através de um espaçador longo e flexível para evitar interferir no sítio de ligação do ligante. Esta alteração na estrutura do ligante, ao contrário do que ocorre com fármacos marcados com trítio (^3H), pode alterar sua conformação, suas propriedades moleculares e afetar sua atividade biológica, razão pela qual ainda não temos uma quimioteca tão rica de ligantes marcados com fluoróforo para todos os receptores de interesse.

3.1.2. Transferência de Energia por Ressonância

A transferência de energia por ressonância de fluorescência, conhecido como FRET (acrônimo do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) é a transferência não radioativa de energia de um cromóforo doador para um cromóforo aceptor e é uma função da distância entre os dois. A mesma transferência não radioativa observada com FRET pode ocorrer quando uma enzima luciferase oxida seu substrato atuando como o doador em vez de um fluoróforo. Isto é o que chamamos de transferência de energia por ressonância de bioluminescência, conhecido como BRET (acrônimo do inglês *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*). Desta forma, o BRET é muito semelhante ao FRET, mas não requer fonte de luz externa para excitar o doador, tendo assim um ruído (*background*) muito baixo e não sofre de problemas frequentemente associados ao FRET, como autofluorescência, dispersão de luz ou fotodegradação.

No caso do BRET, podemos citar mais duas vantagens: 1. Esta técnica se presta muito bem à análise cinética em tempo real das interações ligante-receptor (Stoddart e cols., 2016) aspecto que será discutido mais adiante (vide [capítulo 5.3.](#)). 2. Ao fixar um elemento (*tag*) doador e receptor de energia em proteínas, podemos usar um ligante teste genuíno, não marcado, e avaliar sua capacidade em ativar um receptor e não somente em se ligar ao mesmo. Esta estratégia já foi muito usada no caso de receptores acoplados à proteína G (GPCR), como fizemos para avaliar a capacidade de um ligante sintético original do receptor D2 da dopamina em ativar a proteína Gi (via canônica) e/ou translocar a β -arrestina 2 (via não canônica), como ilustrado na figura 7.

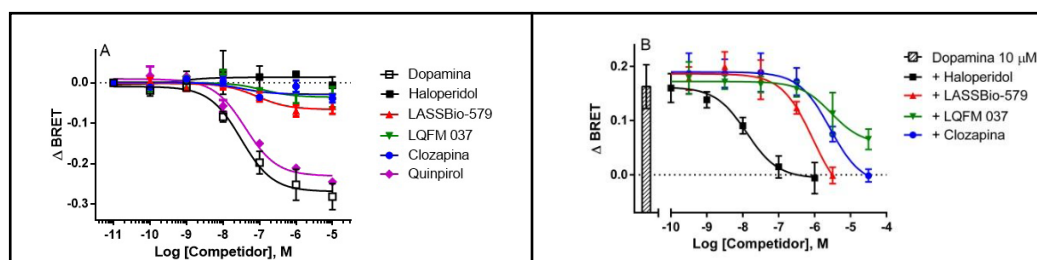


Figura 7. **A.** Curvas concentração-efeito para a ativação de Gi (efeito agonista na via canônica do receptor D2). O sinal de BRET foi medido 5 minutos após estimulação de células HEK-293T. **B.** Curvas concentração-efeito para inibição da translocação de β -arrestina 2 induzida por dopamina. O sinal de BRET foi medido 5 minutos após estimulação de células HEK-293T com dopamina (10 μ M). Adaptado de Silva e cols., 2019.

3.2. Métodos biofísicos

Técnicas biofísicas alternativas estão sendo empregadas para o estudo direto da interação fármaco-receptor sem necessidade de marcação do ligante (*label-free*), como a ressonância plasmônica de superfície, a calorimetria de titulação isotérmica, a termoforese em microescala e a microscopia eletrônica em temperaturas criogênicas (Fang, 2012; vide [Dica 9](#)).

3.2.1. Ressonância plasmônica de superfície

A ressonância plasmônica de superfície (RPS) é a técnica de ligação sem marcação mais popular. A RPS emprega ondas eletromagnéticas que viajam ao longo da interface entre um metal e um dielétrico. Estas ondas estimuladas por luz incidente servem para detectar a ligação de fármacos aos receptores imobilizados em uma superfície de ouro (Fang, 2012). Esta técnica originou-se nos anos 1980 na empresa Pharmacia que criou uma nova empresa especialmente dedicada ao desenvolvimento de nova tecnologia para biossensores e resultou no lançamento do aparelho BIAcore em 1990 (Liedberg e cols., 1995). O uso da tecnologia de microfluidos permitiu a miniaturização do sistema e medidas contínuas da cinética de associação e dissociação do fármaco. Assim sendo, esta metodologia é muito eficiente e sensível para o estudo da cinética de ligação de um fármaco genuíno, não marcado, e é muito útil para o processo de descoberta de novos fármacos. A principal limitação desta técnica reside na necessidade de fixação do receptor (que deve ser purificado) no suporte de ouro, o que pode alterar sua conformação e gerar valores de afinidade diferentes dos encontrados quando o receptor esta em meio líquido. Por esta e outras razões parece ser uma técnica bem mais interessante quando se quer focar em um determinado receptor do que para fazer um *screening* em dezenas de potenciais alvos, por exemplo.

3.2.2. Calorimetria de titulação isotérmica

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (CTI) mede a mudança de calor que ocorre quando um fármaco teste se liga a uma proteína alvo, sendo a única técnica que mede diretamente a entalpia de ligação. Como a CTI permite a medição precisa da afinidade de um ligante para seu receptor (e portanto, o cálculo da energia livre de ligação - vide [cap. 6.3.](#)), é possível calcular o componente entrópico e, assim, traçar um perfil completo dos aspectos termodinâmicos da ligação. Em termos práticos, uma vantagem é de poder realizar adições sequenciais de ligante e realizar uma curva concentração-ligação cumulativa dentro de um único experimento.

Como toda técnica, a CTI tem suas limitações entre as quais podemos citar:

- Sensibilidade relativamente baixa já que complexos não covalentes podem gerar entalpias muito pequenas;
- Necessidade de preparação relativamente pura do receptor;
- Alto consumo de proteína alvo;
- Interferência de solventes como DMSO, frequentemente usado para dissolver fármacos;
- Velocidade e rendimento baixos, tornando a técnica inadequada para *screening*;
- Falta de informações sobre a cinética da ligação.

Já em 2001, o uso desta técnica no processo de descoberta de fármacos foi objeto de revisão detalhada que abordou os diferentes aspectos da CTI, tanto teóricos como práticos (Ward & Holgate, 2001). Com o advento de microcalorímetros mais modernos, a quantidade de material a ser usado diminuiu e a técnica se popularizou, inclusive como ferramenta de apoio para o planejamento de novos ligantes (Paketuryte e cols., 2019). De forma geral, uma substância cuja afinidade depende mais de uma diminuição de entalpia (*enthalpy-driven reaction*) pode ser mais atrativa do que uma substância com igual afinidade dependendo de aumento de entropia (*entropy-driven reaction*).

3.2.3. Termoforese em microescala

A termoforese em microescala (comumente apelidada de MST, acrônimo do inglês *Microscale Thermophoresis*) é uma técnica mais recente (Jerabek-Willemsen, 2014) baseada na detecção de uma mudança de fluorescência em uma amostra quando é aplicado um gradiente de temperatura através de um laser infravermelho. Esta mudança de fluorescência da proteína alvo (intrínseca ou obtida por ligação covalente de uma sonda fluorescente) em função da temperatura é alterada pela ligação do fármaco. A MST permite estimar indiretamente as contribuições entrópicas e entálpicas para estas interações bimoleculares receptor-fármaco através do gráfico de van't Hoff (vide [Cap. 6.3.](#)). Outra vantagem da MST é que é uma técnica muito sensível que permite a medição das interações diretamente em pequeno volume de solução (microlitros) sem a necessidade de imobilização em uma superfície.

3.2.4. Microscopia eletrônica em temperaturas criogênicas

Uma revolução na biologia estrutural ocorreu nos últimos anos, devido a avanços dramáticos na tecnologia de microscopia eletrônica em temperaturas criogênicas - crio-EM. A recente revolução na crio-EM produziu uma explosão de estruturas em resolução quase atômica (até 1,2 angstroms em alguns casos). Esta técnica teve um impacto profundo na descoberta de fármacos, definindo os modos de ligação e mecanismos de ação de fármacos conhecidos, e impulsionando o planejamento e o desenvolvimento de novas substâncias ativas (Van Drie & Tong, 2020).

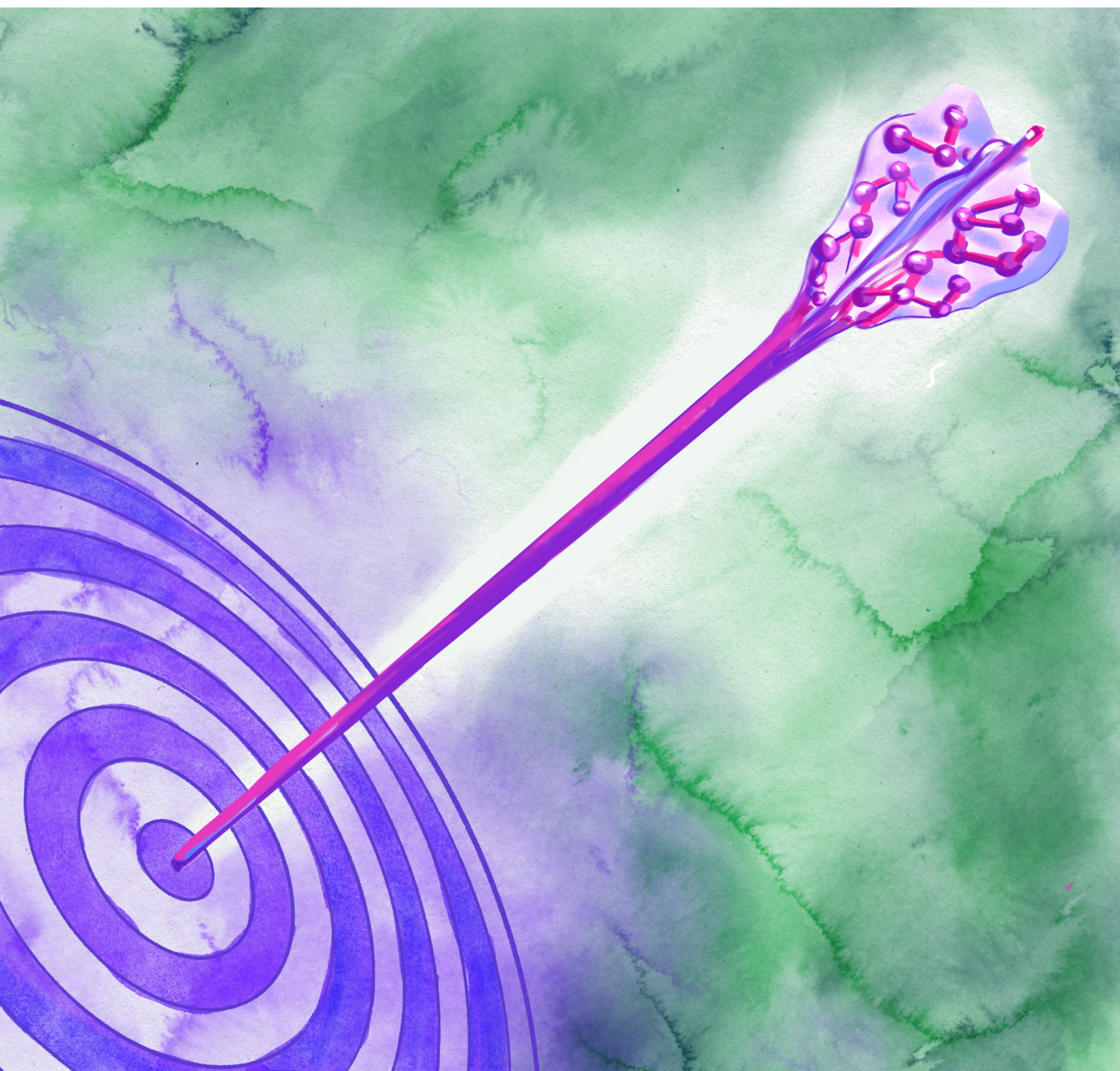
Apesar de algumas vantagens oferecidas por estas alternativas, limitações técnicas fazem com que o ensaio clássico de *binding* por filtração, outrora reconhecido como método de escolha no *screening* de grande número de substâncias na busca de **hits** (de Jong e cols., 2005), continua sendo utilizado inclusive em empresas prestadores 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.

4 Capítulo 4

Ensaio de ligação direto

“A simplicidade é a sofisticação suprema”

Leonardo da Vinci



Ensaio de ligação direto

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, uma nova substância estudada dentro de um programa de descoberta de novos fármacos, a radiomarcagem pode ser encomendada a estas mesmas empresas, apesar de ser um procedimento caro.

4.2. Aspectos práticos

Antes de entrar nos fundamentos e aspectos práticos dos ensaios propriamente ditos, iremos 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*.

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 formados entre o fármaco e o receptor, 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 ($> 20 \text{ Ci/mmol}$), 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, o que é importante, pois este aumenta a radiólise do produto. Finalmente, o trítio possui longo tempo de meia-vida radioquímica (12,32 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 pesado na substância de interesse; geração de moléculas marcadas danificadas, alto grau de radiólise e curta meia-vida radioquímica (59,49 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 $[^3\text{H}]\text{-8-OH-DPAT}$, 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 membranar

a partir do homogenato (caso o receptor seja localizado na membrana plasmática, como em três das quatro superfamílias de receptores fisiológicos: ionotrópicos, metabotrópicos e receptores ligados à cinases), 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 de interesse. Apesar do maior custo e sofisticação técnica necessários para produzir a preparação, esta técnica está sendo cada vez mais 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 dopaminérgico D₄, por exemplo, para o qual não existe radioligante suficientemente seletivo. No caso destas células transfectadas, é também preferível usar uma preparação membranar 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 a sistemas 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 receptores acoplados a proteína G (vide [Capítulo 6.1.](#)). Desta forma, é impor-

tante avaliar de forma crítica a composição do meio de incubação quando se quer comparar dados obtidos em laboratórios diferentes.

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 estará 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 dissocie, já que a reação é reversível na maioria dos casos.

O método mais utilizado e considerado como padrão-ouro é a filtração a vácuo (Fig. 8), 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 diminuirá 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 ressuspenso 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 de proximidade de cintilação (*Scintillation Proximity Assay* - SPA) que não necessitam de separação física do radioligante livre, o que facilitou muito o uso de ensaios de radioligação em plataformas de HTS. A chave para esta tecnologia é a capacidade de incorporar cintilantes em microesferas contendo o receptor imobilizado na sua superfície. Desta forma, o ligante livre em solução no meio de incubação estará distante demais do cintilante para poder excitá-lo devido ao fenômeno de *quenching* que ocorre em meio aquoso (Blass, 2011). Infelizmente, esta técnica é mais cara, o que pode ser limitante para um laboratório acadêmico.

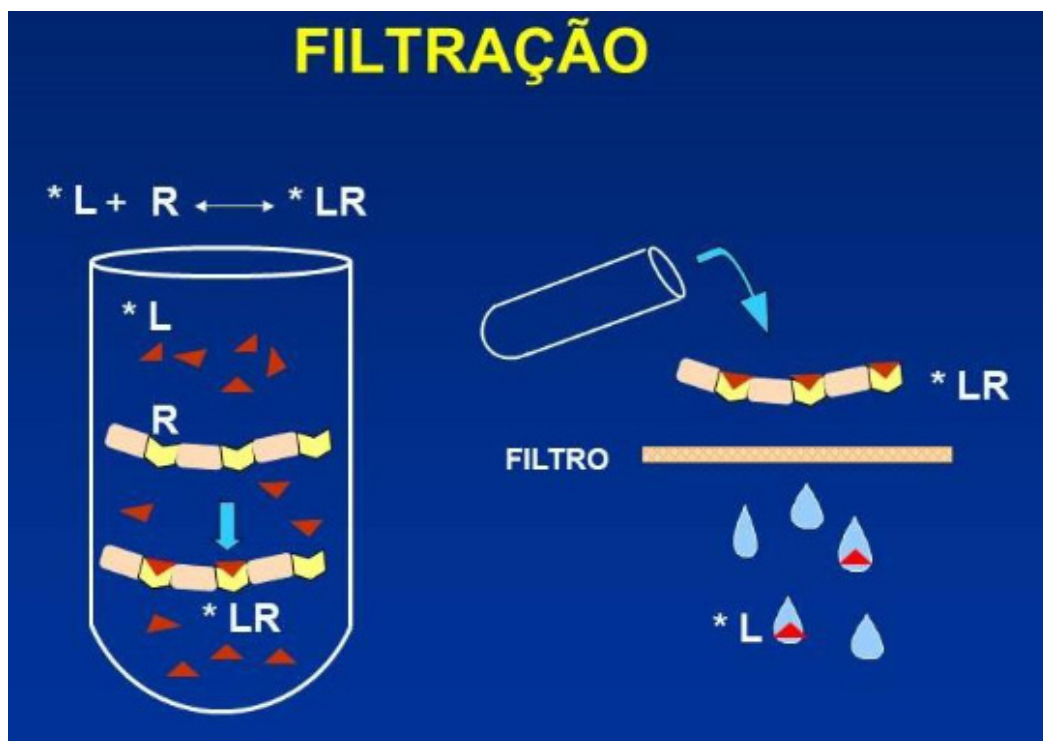


Figura 8. Esquema ilustrando o processo de incubação e filtração a vácuo para separar o complexo radioligante (*L)- receptor (R) (*LR, retido no filtro) do radioligante livre (*L).

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

Equação 2

$$T = S + NS$$

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

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 corresponda 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. 9).

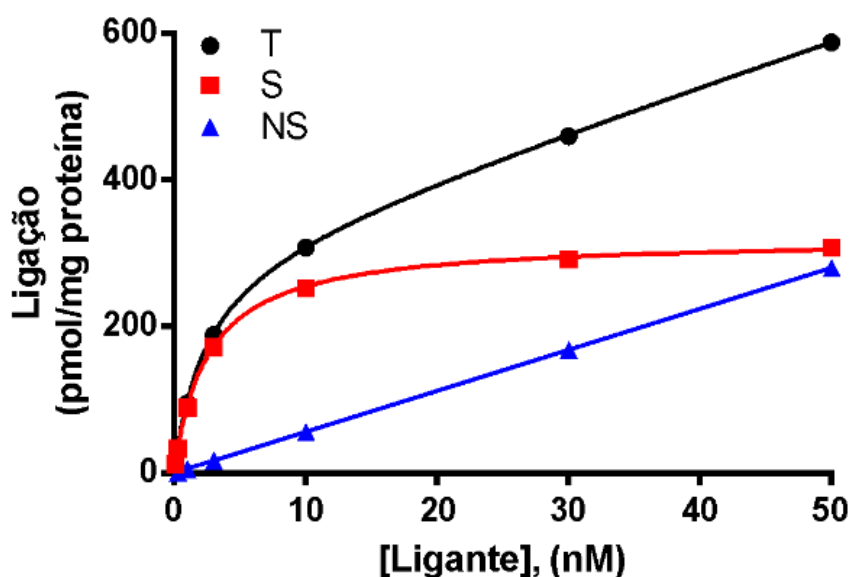


Figura 9. Experimento de saturação. A ligação específica ao receptor (ligação saturável, S) é determinada ao subtrair ponto a ponto a ligação inespecífica (NS, não saturável) da ligação total (T). Simulação com valores arbitrários.

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 que ficou ligado ao filtro.

4.2.5.3. Lavagem e uso de antiadsorventes

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, como usamos para ligação de [³H]-cetanserina ao receptor 5-HT_{2A} de cérebro de rato (Neves e cols., 2010).

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, para os quais verificamos haver saturação dos filtros, e perda de material através da trama do mesmo, quando se usa mais de 200-250 µg proteína por filtro.

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), como no caso dos filtros HAWP 29325 (Millipore®) de 0,45 μm de porosidade que usávamos em experimentos de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Cunha e cols., 1992).

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 10, 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.

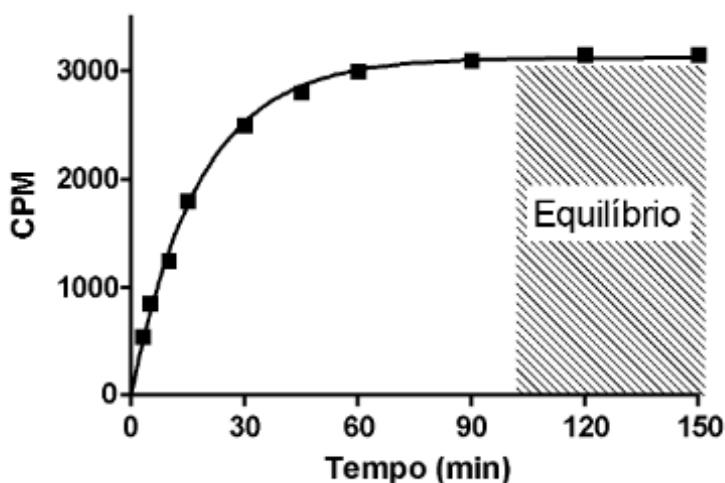
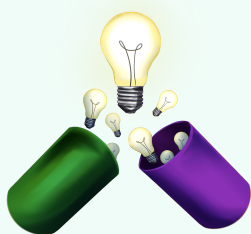


Figura 10. Evolução temporal da ligação específica (*Time-course*). Simulação com valores arbitrários de contagem (CPM = *Counts Per Minute*).

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/poços” 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 (Pompeu e cols., 2013), 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 nosso 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 e/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 (muito) 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 (Kenakin, 2009), o número de concentrações deveria ser ≥ 6 , sendo recomendado pelo menos três concentrações abaixo e três acima do K_d e uma igual ao K_d . Como pode-se ver na Figura 11, 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. 11A) ou logarítmica (Fig. 11B) para as concentrações.

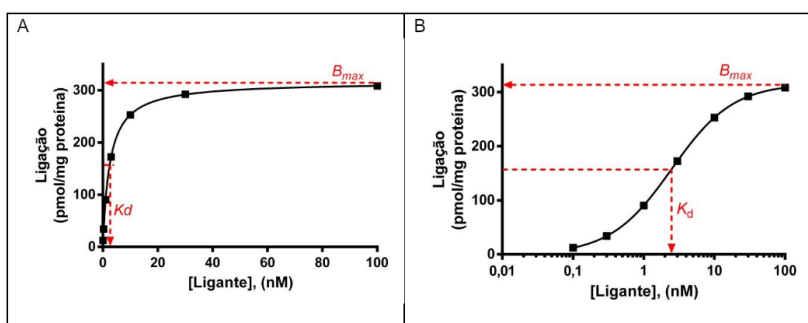


Figura 11. Análise de dados de saturação na presença de uma única população de receptores. Dados teóricos foram gerados utilizando a equação de Hill-Langmuir (vide Figura 1, Equação 1A) e os seguintes parâmetros: $B_{max} = 316$ pmol/mg proteína e $K_d = 2,5$ nM. Notem que as curvas se apresentam como 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. 12) e 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).

Equação 3

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

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 12A, 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 12B, 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).

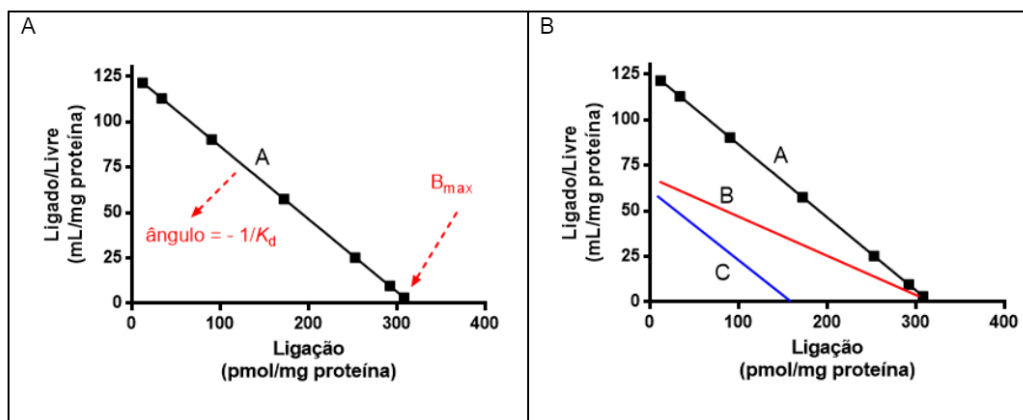


Figura 12. Gráfico de Scatchard. A: os dados teóricos da Figura 11 foram representados de acordo com a equação de Scatchard. B: Curvas teóricas correspondendo a outros dois fármacos (B e C) são representadas para ilustrar diferenças de número máximo de sítios de ligação (C) ou afinidade (B), em relação ao fármaco A. As curvas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01.

Qualquer que seja a representação gráfica escolhida (Fig. 11A, 11B ou 12A), 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, simulamos 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 13A, 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. 13B).

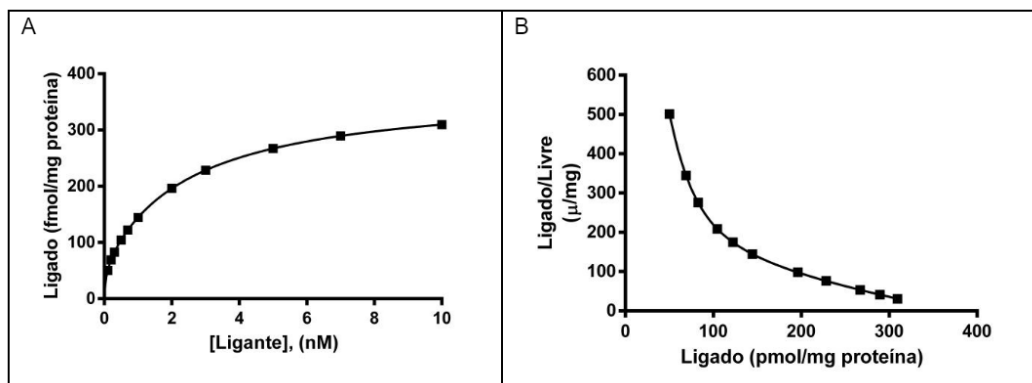


Figura 13. Análise de dados de saturação na presença de duas populações de receptores e de um radioligante seletivo. Dados teóricos foram gerados utilizando a equação correspondendo à soma da ligação aos dois receptores, e os seguintes parâmetros: sítios de alta afinidade com B_{\max} de 57 fmol/mg proteína 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 14 mostra um experimento ilustrando esta situação, quando a avaliação da ligação da $[^3\text{H}]$ -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.

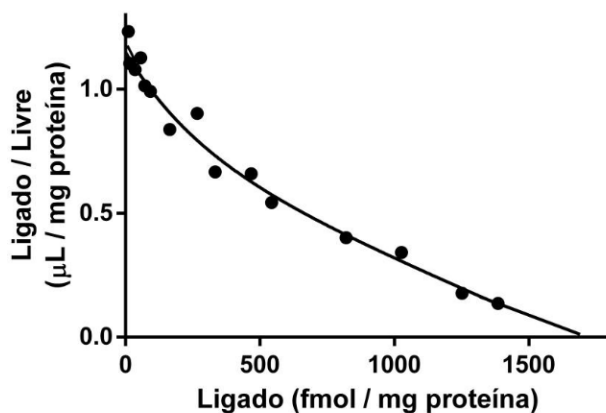


Figura 14. Gráfico de Scatchard para ligação da $[^3\text{H}]$ -ouabaína em homogenato de *Schistosoma mansoni*. Os dados de ligação específica foram analisados por regressão não linear utilizando-se o modelo de duas populações de sítios diferentes. Os parâmetros obtidos foram: sítios de alta afinidade com B_{max} de $0,123 \pm 0,027$ pmol/mg proteína e K_d de $0,241 \pm 0,076$ μM ; e sítios de baixa afinidade com B_{max} de $1,55 \pm 1,11$ pmol/mg proteína e K_d de $2,34 \pm 0,21$ μM . 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, mostramos na Figura 15B o gráfico de Scatchard obtido em ensaio de saturação com o ácido caínico para marcar os receptores glutamatérgicos do tipo cainato em cerebelo de galinha. Pode-se observar claramente o aspecto convexo do gráfico, enquanto que a representação dos dados não transformados parece normal (Fig. 15A), mais uma vez ilustrando uma das características da representação de Scatchard na identificação de comportamentos atípicos.

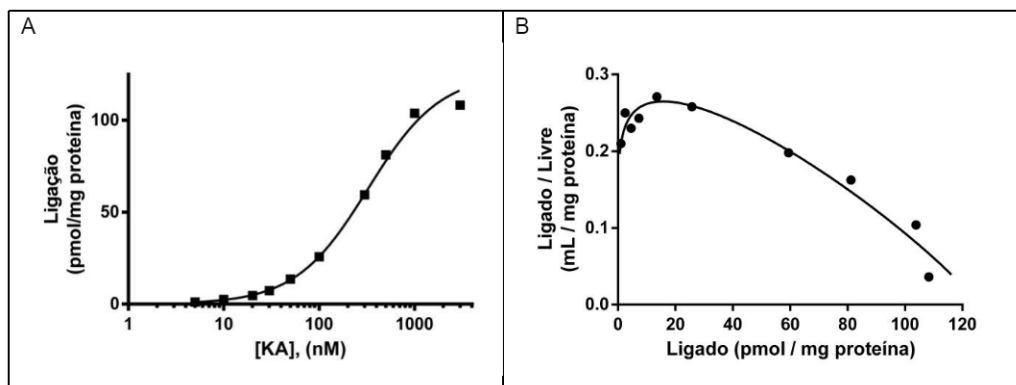


Figura 15. Gráfico de Scatchard para ligação do $[^3\text{H}]$ -cainato em preparação de cerebello de galinha. A curva teórica foi obtida usando-se os parâmetros calculados por regressão não linear a partir dos dados não transformados utilizando o modelo de Hill (vide [Capítulo 5.2.2.2](#)). $B_{\text{max}} = 125 \pm 7$ 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. KA (*kainic acid*): ácido caínico.

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 16A.

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}).

Equação 4

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

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 podemos encontrar na literatura representações lineares desta equação, onde k_{obs} é obtido pelo valor do coeficiente angular da reta, como mostrado na Figura 16B.

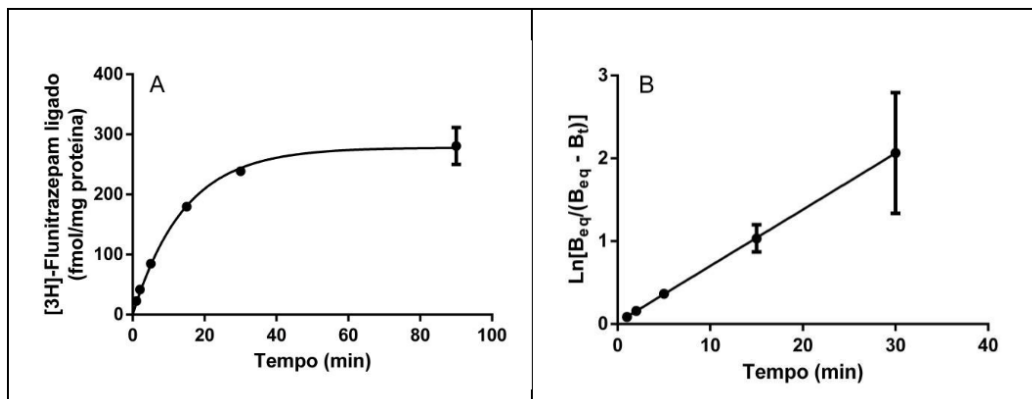


Figura 16. Cinética de ligação do $[^3\text{H}]$ -flunitrazepam (0,2 nM) a sinaptossomas de cérebros de ratos. A. A curva foi ajustada através de regressão não linear utilizando o modelo de associação monoexponencial. B: análise alternativa, para linearização dos dados e uso de regressão linear, atualmente em desuso (vide Capítulo 7): gráfico de $\ln [B_{eq} / (B_{eq} - B_t)]$ 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).

Equação 5

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

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 reassociar 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.

Equação 6

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

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. 17A) ou reta (Fig. 17B), dependendo da escala usada na ordenada (aritmética ou logarítmica, respectivamente).

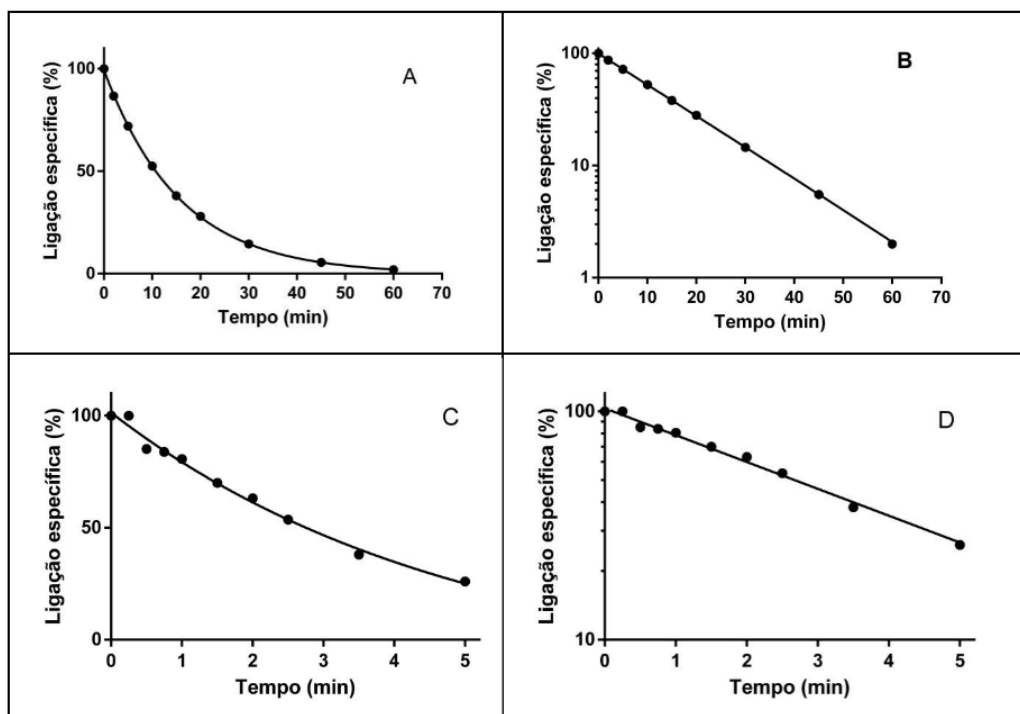


Figura 17. Cinética de dissociação. Os dados são representados por uma monoexponencial decrescente se usar escala aritmética (A), ou por uma reta se usarmos uma escala logarítmica

(B). As curvas teóricas foram geradas com o programa GraphPad Prism 6.01. C e D: Cinética de dissociação da $[^3\text{H}]$ -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 semilogarítmica, como ilustrado na Figura 18 para o caso da ligação da $[^3\text{H}]$ -ouabaína à Na^+, K^+ -ATPase de *Schistosoma mansoni*.

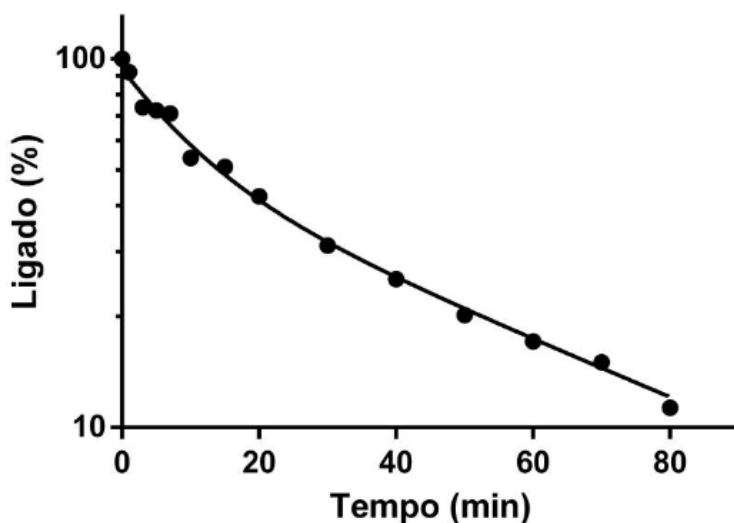


Figura 18. Cinética de dissociação da $[^3\text{H}]$ -ouabaína em homogenato de *Schistosoma mansoni*. Os dados de ligação foram analisados por regressão não linear utilizando-se o modelo de duas populações de sítios. Os parâmetros obtidos foram: $43 \pm 7\%$ de sítios de baixa afinidade (dissociação 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 14](#)). Adaptado de Souto Pardon e Noël, 1994.

4.4.2.2. Cooperatividade

Existe pelo menos 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 alostérico](#) 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. Descoberta de fármacos: avaliação do mecanismo de ação molecular de novos protótipos (*lead compounds*)

Em projeto de descoberta de fármacos, uma vez eleito o **protótipo** 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 descoberta e desenvolvimento de fármacos, como discutido no **Capítulo 5.3**.

Nota-se que a radiomarcagem de um protótipo é também necessária para poder estudar a sua distribuição tecidual em duas espécies animais, que deve constar da documentação a ser entregue à FDA (*Food and Drug Administration*, agência reguladora dos Estados Unidos da América) para solicitar autorização para iniciar os estudos clínicos (*New Drug Application*). Para os interessados no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, este estudo de distribuição tecidual é uma das 29 tarefas a serem executadas no **jogo SCREENER** (Noël & Xexéo, 2021).

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 a doença de 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 19, 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).

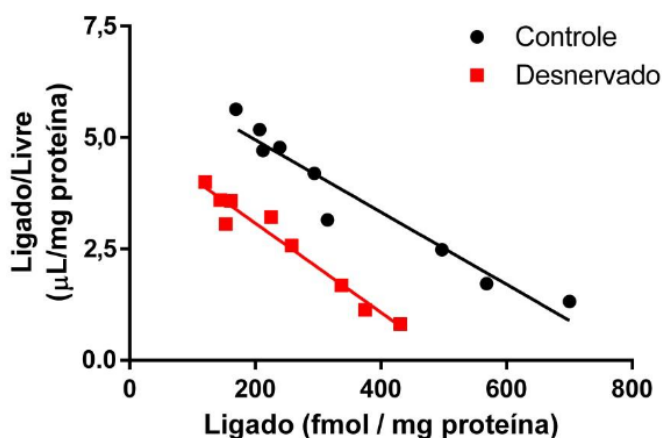


Figura 19. Gráfico de Scatchard para ligação específica de $[^3H]$ -ouabaína em preparação bruta de ducto deferente de ratos Wistar adultos: grupo controle e tratado (14 dias após desnervação cirúrgica). Adaptado de Quintas e cols., 2000. Para interpretação de gráficos de Scatchard, consulte a [Figura 12](#).

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 20 mostra que o número de sítios de ligação da $[^3H]$ -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).

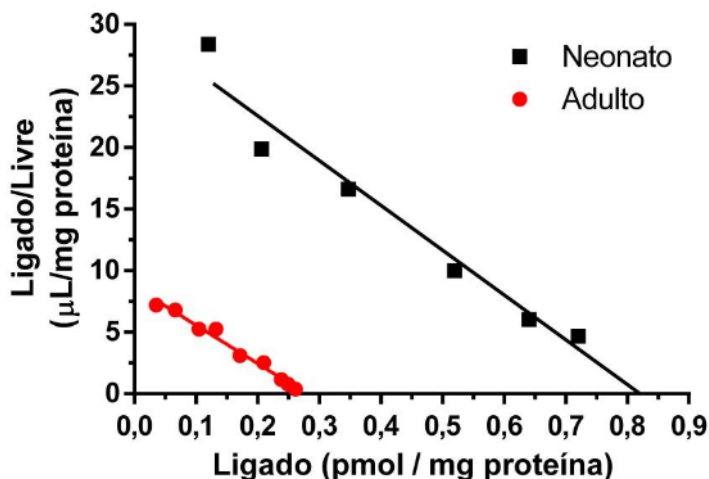


Figura 20. Gráfico de Scatchard para ligação específica de $[^3\text{H}]$ -ouabaína a preparações brutas de coração de rato recém-nascido (neonato, 24 h) e adulto (3 meses). Cada ponto é a média das determinações em triplicata num experimento típico. Adaptado de Lopez e cols., 2002. Para interpretação de gráficos de Scatchard, consulte a [Figura 12](#).

- Distribuição de receptores no organismo:

Estudos de saturação podem ser usados para estabelecer 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 $[^3\text{H}]$ -8-OH-DPAT (Hall e cols., 1985).

5 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



Capítulo 5

Ensaio de ligação indireto (com substâncias testes não marcadas)

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 protótipo para o qual se decidiu investir no processo de radiomarcagem (vide **Capítulo 4**), na fase de *screening* e de otimização de 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 ou sítios sobrepostos (*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 21.

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

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 de metade a 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).

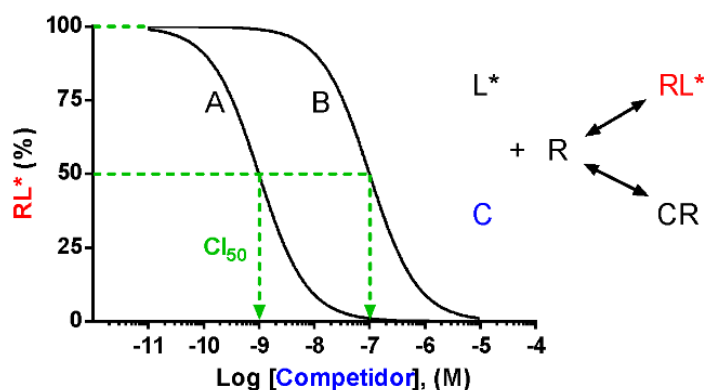


Figura 21. Esquema ilustrando o princípio do ensaio de competição para determinação da afinidade de uma substância teste, não marcada. O valor da ligação específica do radioligante medida na ausência de competidor (controle) é considerado como 100%. Nesta simulação, a substância B necessita de concentrações maiores do que a substância A para diminuir a ligação do radioligante, o que pode ser quantificado pelo valor de Cl_{50} 100 vezes maior, indicando uma afinidade 100 vezes menor.

Uma vez determinado o valor de Cl_{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](#)).

Equação 8

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

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 (vejam a discussão na [27ª matéria do glossário semântico de farmacologia](#)). Esta diferença é ilustrada na Figura 22, 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 igual ou inferior a duas vezes.

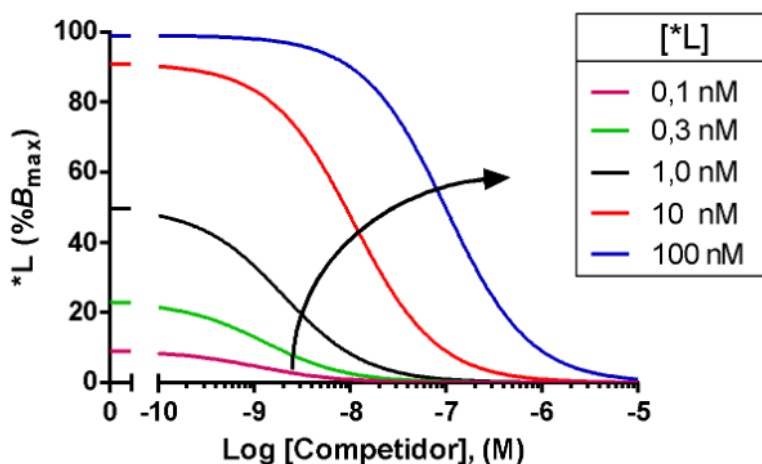


Figura 22. Curvas de competição: efeito da concentração do radioligante sobre o valor de CI_{50} do competidor. As curvas foram simuladas considerando valores idênticos (1 nM) para o K_d do radioligante e o K_i do competidor. Os valores de CI_{50} passam de 1,1 nM para 99 nM, quando a concentração do 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.](#), *competition association assay*) (Kenakin, 2009).

Esta consideração é importante porque se o tempo de incubação for insuficiente, haverá subestimação da potência (medida através do Cl_{50}) e portanto da afinidade (K_i) da substância teste, o que pode gerar importantes erros no caso de ligantes com cinética lente (*slow binding inhibitors*). Discutimos esta consideração metodológica de forma aprofundada em artigo avaliando a afinidade de ligação e potência inibitória de quatro glicosídeos cardíacos na Na^+, K^+ -ATPase de rim de porco (Noël e cols., 2018). No caso, os dados da figura 23 mostraram que um tempo de incubação de 10 minutos, como usado por alguns autores, subestima a potência da ouabaína para inibir a enzima de rim de porco para a qual possui alta afinidade.

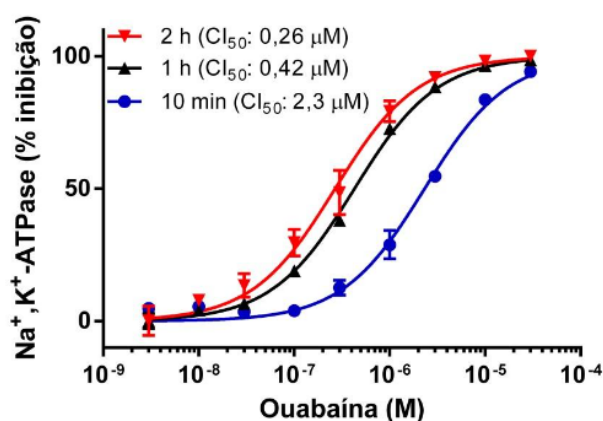


Figura 23. Curvas concentração-efeito para a inibição da Na^+, K^+ -ATPase de rim de porco pela ouabaína: efeito do tempo de incubação. Vejam que uma incubação excessivamente curta (10 min) gera um Cl_{50} 10 vezes maior do que quando a incubação é de 2 h. Adaptado de Noël e cols., 2018.

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 90 e 10% do E_{\max} está 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 24.

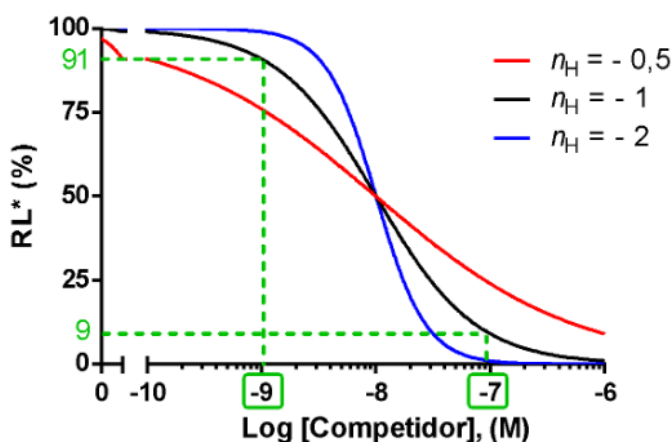


Figura 24. Curvas de competição com diferentes inclinações. As curvas teóricas foram simuladas considerando-se o mesmo valor de CI_{50} (10 nM) e diferentes valores do coeficiente de Hill. Quando $n_H = -1$, a faixa de concentrações onde ocorre o “efeito” (9-90%) corresponde aproximadamente a duas unidades 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. 25). 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.

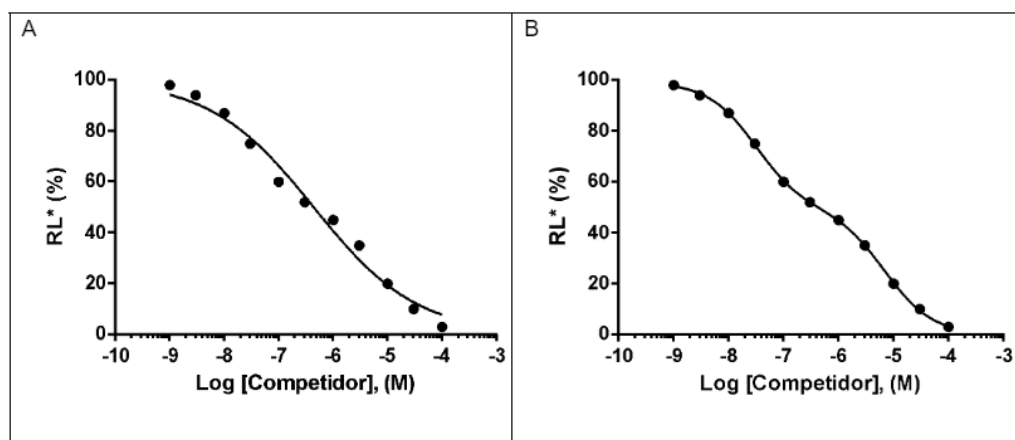


Figura 25. Análise de curva de competição atípica. A. Os dados, teóricos, foram analisados por regressão não linear com o modelo de Hill (equação 7 com adição de coeficiente de Hill – vide Dica 4, equação 9), obtendo-se os seguintes parâmetros: $CI_{50} = 0,44 \mu M$ e $n_H = -0,45$. Apesar do ajuste (*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 ($CI_{50} = 30 nM$) e 50% de sítios de baixa afinidade ($CI_{50} = 7 \mu M$). Como podemos observar, o ajuste foi melhor, o que pode ser aferido não somente pela análise visual como também pelo maior 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**).

Equação 9

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

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 de novos fármacos. No caso dos ensaios indiretos, de competição, eles são usados de rotina para o *screening* farmacológico visando à seleção de **substâncias ativas (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**. 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 substâncias de referência é indispensável e deve ser realizada com os devidos cuidados (Fig. 26).

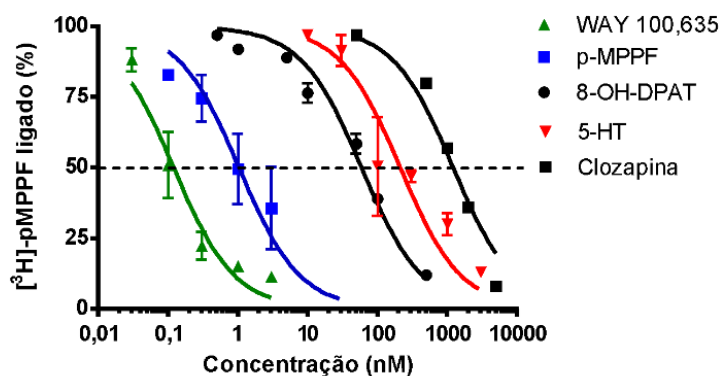


Figura 26. Curvas de competição com diferentes ligantes, para validação do ensaio de *binding* ao receptor 5-HT_{1A}, utilizando o antagonista [³H]-pMPPF como radioligante. Retirado de: Portfólio de ensaios do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, ICB-UFRJ (disponível em: <http://francoisnoelfarmac.wixsite.com/fnoel/laboratorio>).

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 Relação Estrutura-Atividade (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 modo racional, em projetos direcionados para um alvo (*Target-Based Drug Discovery*). Neste caso, é importante acompanhar o efeito das modificações estruturais sobre a afinidade para o alvo, como, por exemplo, na etapa de **otimização de protótipo**.

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 no 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 (quimioteca), 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. É exatamente o que fizemos quando decidimos revisar a urosseletividade farmacodinâmica dos antagonistas do receptor α_1 -adrenérgico utilizados para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (Quaresma e cols., 2019). Com esta estratégia, fomos capazes de concluir que a urosseletividade da tamsulosina não podia ser explicada por sua baixa seletividade para o receptor adrenérgico do subtipo α_{1A} (somente 5 vezes em relação ao α_{1B}), e que sua afinidade para os recep-

tores dopaminérgicos D₂ e D₃ era provavelmente muito baixa para poder explicar a disfunção ejaculatória relatada para este fármaco.

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 não-alvo/ K_i 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.

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, apresentamos 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. 27), estudamos o efeito do PCALC36 sobre curvas de concentração-ligação da [³H]-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 [³H]-ouabaína (inclinações semelhantes das curvas), mas diminuiu o seu número máximo de sítios de ligação de maneira concentração-de-



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 descoberta 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).

pendente (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**).

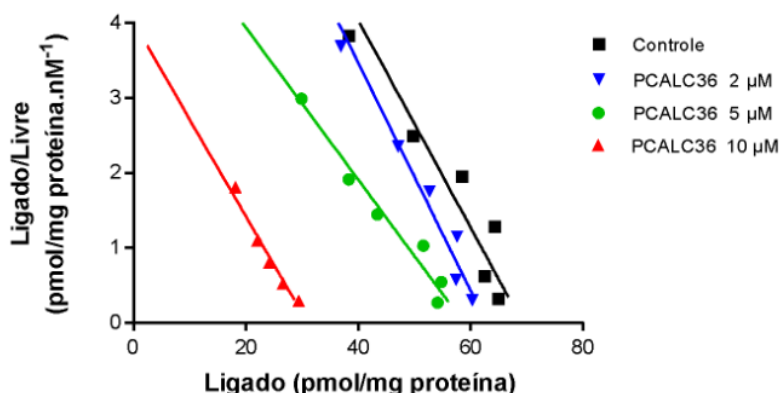


Figura 27. Gráfico de Scatchard para a ligação de $[^3\text{H}]$ -ouabaína em preparação de cérebro de rato na ausência (controle) e presença de concentrações crescentes de PCALC36, um cumes-tano sintético. As curvas foram obtidas por regressão não linear dos dados não transformados (*i.e.*, ligação 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, utilizamos outro protocolo visando avaliar diretamente a estabilidade do complexo formado entre a substância competidora (PCALC36) e o receptor. A Figura 28 mostra o resultado do experimento de reversibilidade, onde observamos 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 27.

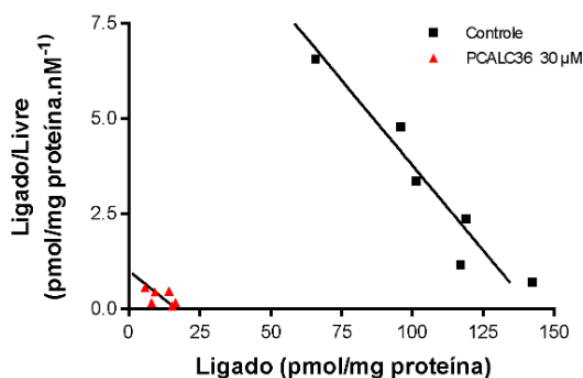


Figura 28. Estudo da reversibilidade do efeito de PCALC36 sobre a ligação de [³H]-ouabaína em preparação de cérebro de rato. A preparação foi pré-tratada com PCALC36 30 µM ou água (controle) durante 2 horas antes de ser lavada por diluição e centrifugação. O *pellet* foi então ressuspenso e usado em 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 [7ª matéria do glossário semântico de farmacologia da SBFTE](#).

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. 29). 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*”. Este tipo de ensaio é bem mais laborioso quando usa-se a técnica de filtração que usamos para separar o radioligante ligado do livre do que em ensaios com ligante marcado com fluorescência, técnica que permite uma leitura contínua em função do tempo, facilitando a obtenção de um grande número de dados, muito importante para o ajuste das curvas por regressão não linear.

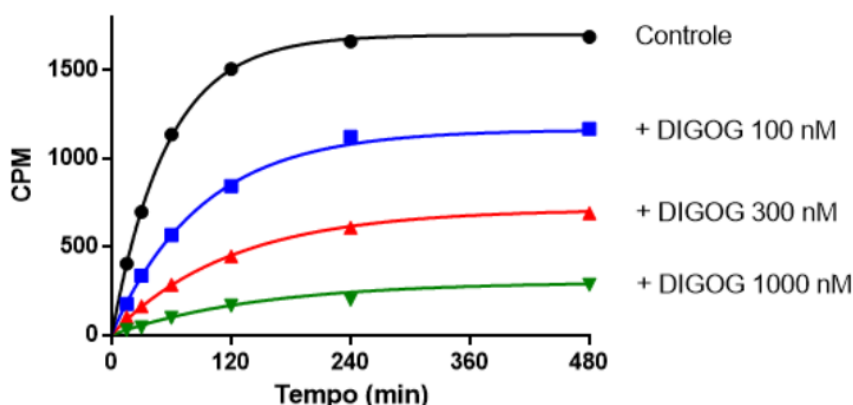


Figura 29. Ensaio de competição de associação para determinar as constantes de velocidade da digoxigenina para sua ligação a Na^+, K^+ -ATPase de rim de porco. A ligação da $[^3\text{H}]$ -ouabaína (0,2 nM) foi realizada em preparação de rim de porco na ausência (controle) e presença de

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. CPM (*Counts Per Minute*) = radioatividade correspondendo à ligação específica do radioligante ao seu receptor. 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. 30).

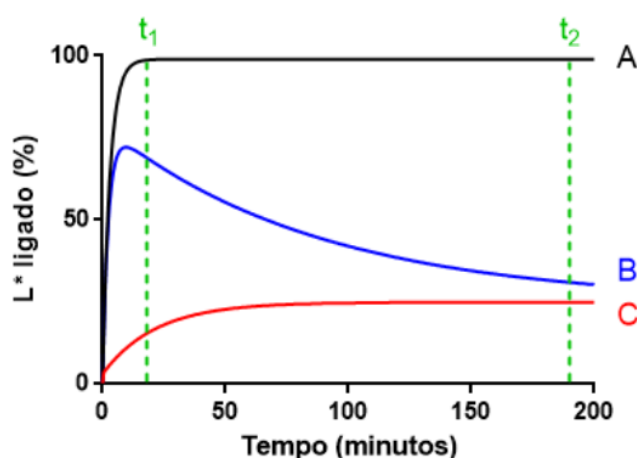
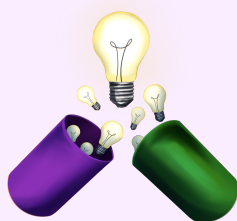


Figura 30. Representação esquemática do ensaio de competição de associação *dual-point*. A: curva de associação do radioligante sozinho (controle). B: curva de associação do radioligante incubado com um competidor não radioativo que se dissocia mais lentamente do que o radioligante. C: curva de associação 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 30 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 31 ilustra esta questão ao mostrar que o perfil das curvas obtidas com duas substâncias testes que apresentam os mesmos 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. Para mais detalhes sobre otimização de condições experimentais para este tipo de estudo, consultar o artigo publicado por Georgi e cols. (2019).

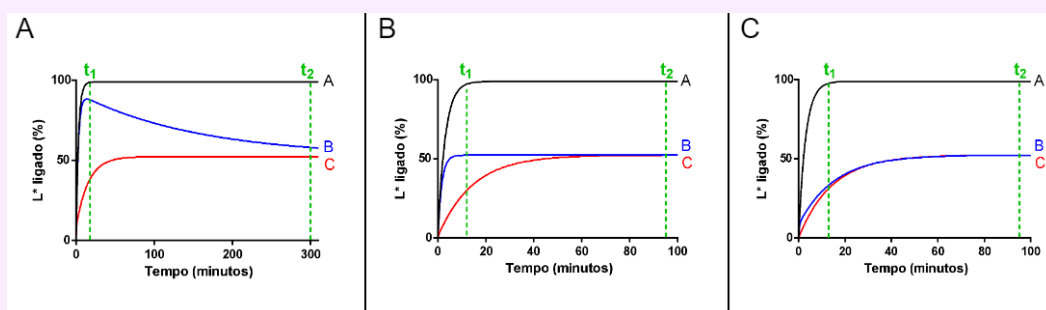


Figura 31. Simulações de ensaio de competição de associação e medida de índice cinético pela técnica de “dual point”, para duas substâncias testes B e C que possuem constantes de velocidade de **dissociação** diferentes. Nestas simulações usamos os mesmos valores indicados na Figura 30 para o radioligante, 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.

A e B: Adaptados de: Azalim e cols., 2020.

Na figura 32, mostramos 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 D_2 . 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).

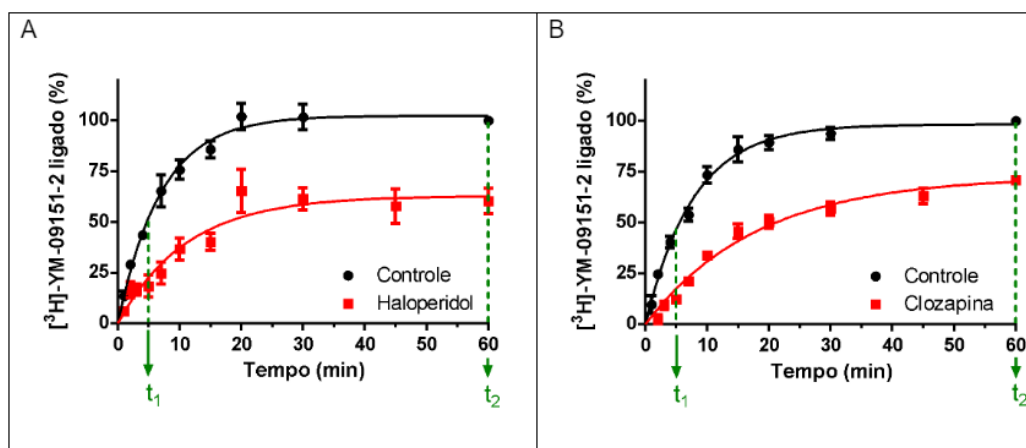


Figura 32. Cinética de ligação do $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$ nos receptores D_2 de corpo estriado de rato na ausência e presença de haloperidol (A) ou clozapina (B). Para o cálculo do índice cinético (KRI), nós dividimos os valores de ligação calculados no tempo de 5 minutos pelos valores no tempo 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 de KRI para ligação do $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$ na presença de clozapina ($0,250 \pm 0,015$) foi significativamente menor do que na presença de haloperidol ($0,360 \pm 0,024$) e do que na ausência de qualquer ligante competidor ($0,510 \pm 0,020$, 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 nos 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 31 já indicou que, de fato, é possível distinguir competidores possuindo diferentes valores de k_{-1} , embora tenham os mesmos valores de k_{+} , pelos perfis diferentes que proporcionam ao medir a cinética de ligação do radioligante com o qual são coincubados. As simulações apresentadas na figura 33 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 33 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} .

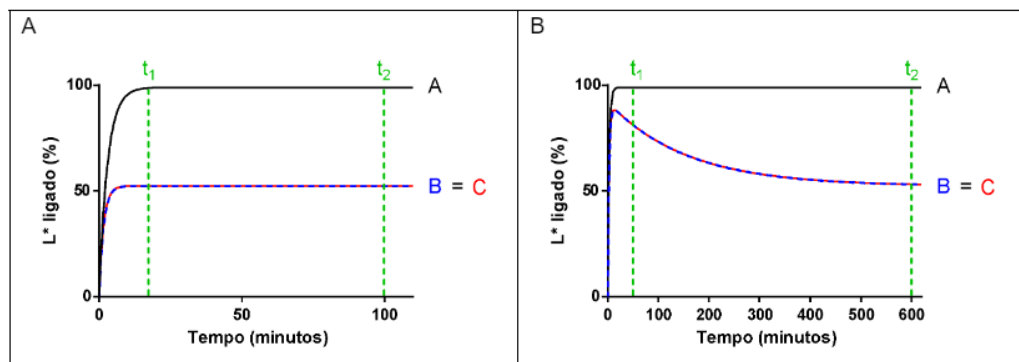


Figura 33. Simulações de ensaio de competição de associação e medida de KRI pela técnica de “*dual point*”, para duas substâncias testes B e C que possuem constantes de velocidade de **associação** diferentes. Nestas simulações usamos os mesmos valores indicados na [Figura 31](#) para o radioligante, 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, recomendamos 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).

Além de desempenhar um papel importante na cinética de sinalização do receptor *per se*, o tempo de residência do ligante poderia influenciar outros aspectos, como a regulação dos fenômenos de [seletividade funcional \(agonismo tendencioso\)](#) e de taquifilaxia, pelo menos para GPCRs. De fato, Herenbrink e cols. (2016) mostraram que a cinética de ligação do ligante e o padrão temporal dos processos de sinalização do receptor tinham uma grande influência sobre a seletividade funcional de uma série de agonistas para o receptor D₂ da dopamina.

O tempo de residência poderia também determinar a ocorrência de taquifilaxia, já que análogos da angiotensina II com menor tempo

de residência no receptor AT1 não apresentam a taquifilaxia observada com o agonista endógeno (Duarte e cols., 2022). Tais dados reforçam o interesse em levar em consideração a cinética de ligação ao receptor em programas de descoberta de novos fármacos para GPCRs.

De acordo com o próprio Copeland, 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 protótipos (Copeland, 2016; 2021).

6

Capítulo 6

Ensaio menos clássicos e aplicações

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

Rabi Nachman de Breslov



Capítulo 6

Ensaio menos clássicos e aplicações

6.1. Eficácia Intrínseca (*Binding* funcional)

6.1.1. GPCRs – 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 ligante 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, antagonistas ou mesmo agonistas inversos). Apesar desta crença inicial, protocolos mais sofisticados de “*binding* funcional” foram desenvolvidos para distinguir agonistas de antagonistas nos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). 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. 34).

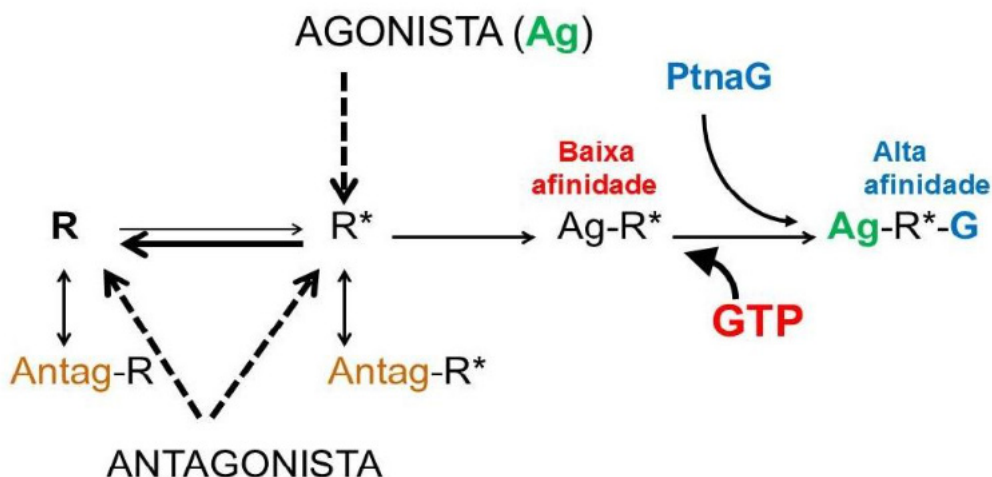


Figura 34. Representação simplificada do modelo de "complexo ternário estendido" para receptores metabotrópicos (GPCRs), onde o agonista liga-se preferencialmente ao receptor no estado ativo (R^*), formando o complexo ternário ($Ag-R^*-G$) de alta afinidade na presença de proteína G. A formação deste 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 quando se utilizava 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 34), 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 GPCRs 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, apresentamos na Figura 35 dados obtidos no processo de validação deste ensaio para o receptor 5-HT_{1A}.

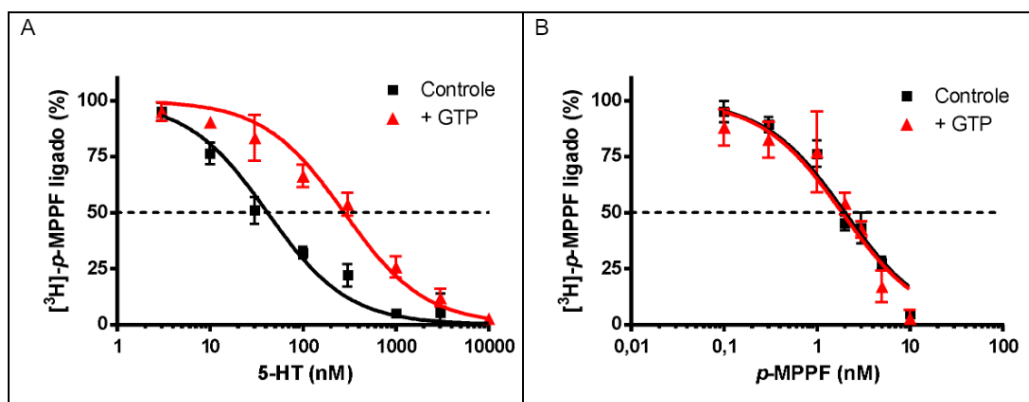


Figura 35. Ensaio de GTP-*shift* para o receptor 5-HT_{1A} (preparação membranar de hipocampo de rato). As curvas de competição foram realizadas utilizando o radioligante antagonista seletivo para o receptor 5-HT_{1A} ([³H]-p-MPPF) na presença ou ausência de GTP 1 mM, em meio padrão não contendo cátions 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 34](#).

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. 36). 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.

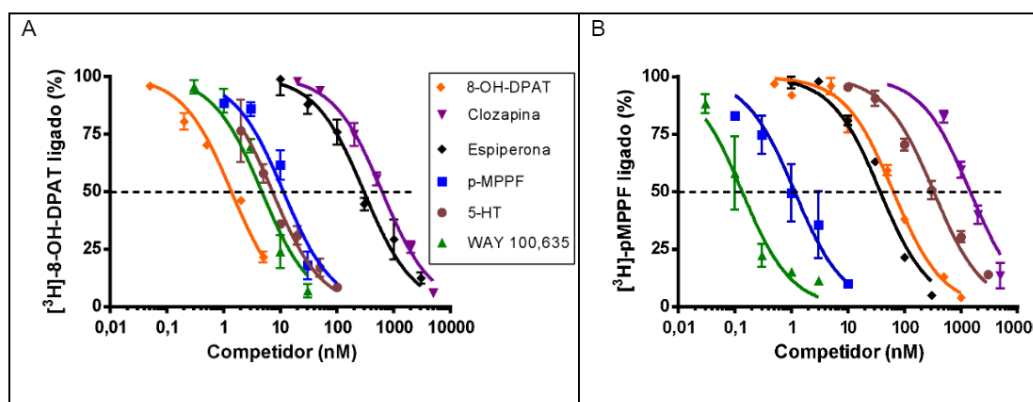


Figura 36. Curvas de competição para ligação ao receptor 5-HT_{1A} por diversas substâncias utilizadas como padrões. A: radioligante agonista $[^3\text{H}]\text{-8-OH-DPAT}$ em meio contendo 1 mM CaCl_2 e 1 mM MnCl_2 . B: radioligante antagonista $[^3\text{H}]\text{-p-MPPF}$ em meio contendo 1 mM GTP e sem cátions divalentes. Curvas médias de 2-3 experimentos independentes realizados em triplicata. Adaptado de Noël e cols., 2014.

Como demonstrado na Figura 37, 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).

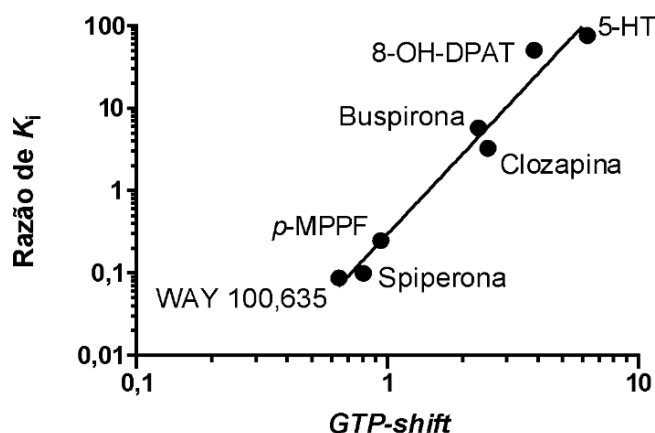


Figura 37. Correlação entre os ensaios de *GTP-shift* e razão de K_i para estimar a eficácia intrínseca de sete ligantes no receptor 5-HT_{1A} (preparação membranar de hipocampo de rato). Teste de correlação de Spearman ($r = 0,964$; $p = 0,0028$). Adaptado de Noël e cols., 2014.

6.1.1.4. *Binding* de [35 S]- GTP γ S

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 [35 S]-GTP γ S, 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 Ca $^{2+}$ (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, apresentamos na Figura 38 os dados que obtivemos na validação deste ensaio para o receptor 5-HT $_{1A}$.

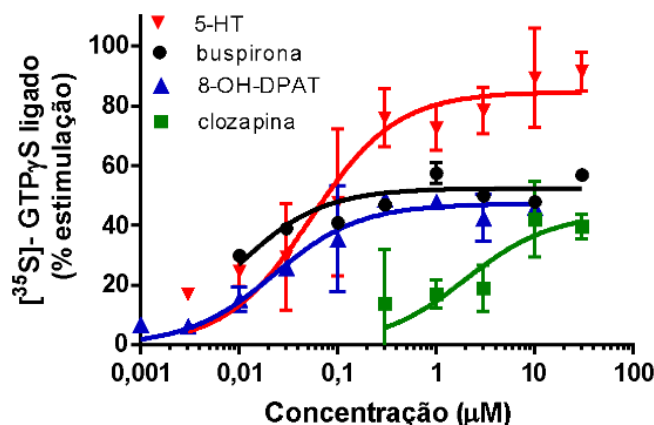


Figura 38. Ensaio de [35 S]-GTP γ S para agonistas plenos e parciais do receptor 5-HT $_{1A}$ (preparação membranar de hipocampo de rato). Os efeitos são representados como % de

estimulação em relação à ligação basal de $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S. As curvas representam as médias de três experimentos realizados em triplicata. Adaptado de Noël e cols., 2014.

6.1.1.5. Na^+ -*shift*

Mencionamos o fato de que o ensaio de GTP-*shift* foi bem sucedido para a maioria dos GPCRs, mas nem todos ([Capítulo 6.1.1.2.](#)). Em tais situações, como no caso do receptor $\text{A}_{2\text{A}}$, 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 GPCRs (Strasser e cols., 2015). No caso, do receptor $\text{A}_{2\text{A}}$, foi possível corroborar do ponto de vista estrutural o papel do Na^+ como **modulador alostérico** negativo graças à obtenção de cristal com um Na^+ alocado em sítio distal do sítio ortostérico (Bissaro e cols., 2019). Os autores propuseram até que o mecanismo deste efeito se devia ao fato do receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ ligado ao Na^+ ser menos eficiente na estabilização da adenosina durante as diferentes etapas da sua ligação.

A Figura 39 mostra o resultado do ensaio que propusemos para este mesmo receptor $\text{A}_{2\text{A}}$, baseado na diferença de afinidade do agonista na presença de MgCl_2 , que favorece a formação do complexo ternário (vide [esquema da figura 34](#)), 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 Cl_{50} medidos no meio contendo NaCl 100 mM e os valores medidos no meio contendo MgCl_2 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 $\text{A}_{2\text{A}}$, nas condições que usamos.

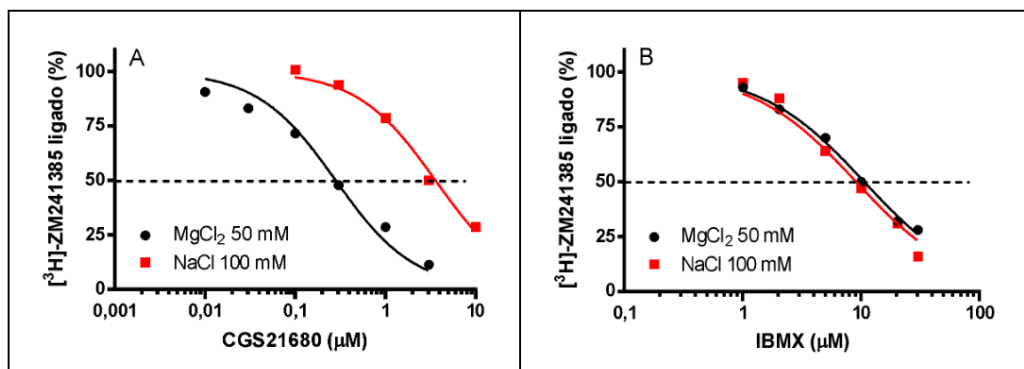


Figura 39. Ensaio de Na^+ -shift. As curvas de competição foram realizadas em preparação membranar de estriado de rato utilizando um radioligante antagonista seletivo para o receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ ($[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$). As curvas de competição do agonista pleno (A: CGS21680) e do 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.

Uma vez validado, pudemos aplicar esse ensaio para avaliar a influência da *N*-metilação de derivados *N*-acilhidrazônicos sobre a eficácia intrínseca ao nível do receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ (Pedreira e cols., 2021). Os dados da figura 40 ilustram nossos resultados com vários derivados, apontando para o fato da drástica mudança de conformação gerada pela *N*-metilação ser capaz de inverter o perfil de eficácia, de agonista inverso, fraco (Fig.40A) para agonista parcial (Fig.40B).

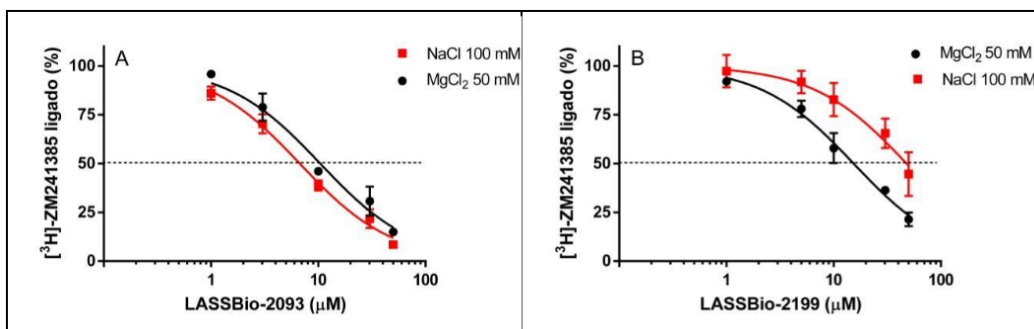


Fig. 40. Ensaio de Na^+ -shift para a estimativa da eficácia intrínseca de dois derivados *N*-acilhidrazônicos no receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ em preparação de membrana de estriado de rato. As curvas de competição foram realizadas usando o radioligante antagonista (0,5 nM $[^3\text{H}]\text{-ZM241385}$) na presença de 50 mM de MgCl_2 ou 100 mM de NaCl . Cada curva representa a curva média de três experimentos pareados independentes (em replicado). (A) LASSBio-2093; (B) LASSBio-2199 (análogo *N*-metilado).



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 selecionar (e/ou induzir) conformações diferentes do receptor 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 (GPCRs, 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 intrínseca 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. Um caso emblemático de sucesso desta estratégia para desenvolver novos medicamentos mais seletivos é a aprovação pela FDA da oliceridina para tratamento da dor aguda grave em adultos, em agosto de 2020 (Markham, 2020). Ao contrário dos agonistas opioides atualmente em uso, a interação da oliceridina com o receptor opioide do tipo μ é seletiva para a via da proteína G, com baixa potência para o recrutamento de β -arrestina, o que explicaria a menor prevalência dos efeitos adversos relacionados à função respiratória em comparação com a morfina. A oliceridina foi assim o primeiro fármaco planejado para apresentar seletividade funcional a ser aprovado para uso clínico.

6.1.2. Receptores ionotrópicos

Apesar de ser bem menos comum do que para os GPCRs, 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 de curta duração 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, podemos 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. Alostерismo

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 34](#), 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; Haskell-Luevano & Meanwell, 2019). *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 [oitava matéria do glossário semântico de farmacologia](#).

6.2.2. Aspecto prático

6.2.2.1. Tipos de ensaio

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 41(A).

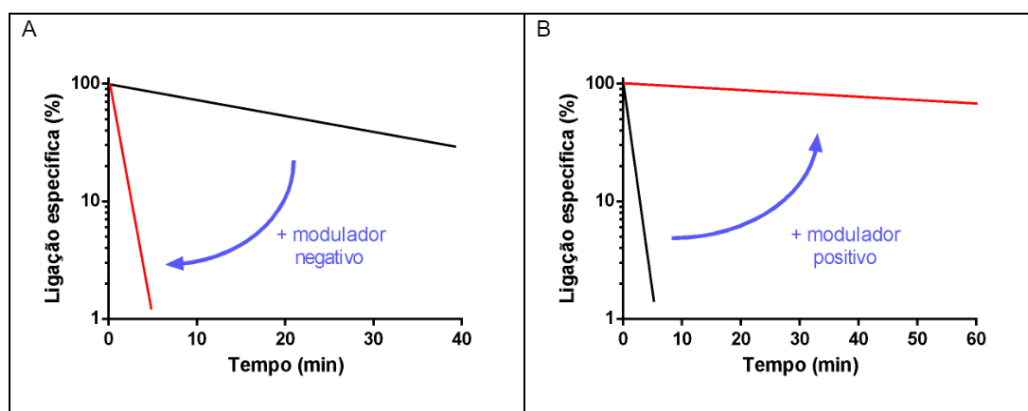


Figura 41. Efeito de moduladores alostéricos sobre a cinética de dissociação de um radioligante ortostérico. A: efeito de um modulador alostérico negativo sobre a cinética de dissociação de um radioligante ortostérico. Esta simulação foi feita para ilustrar o efeito da 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida sobre a cinética de dissociação da $[^3\text{H}]$ -ioimbina, no receptor α_2 humano. B: efeito de um modulador alostérico positivo sobre a cinética de dissociação de um radioligante ortostérico. Esta simulação foi feita para ilustrar o efeito do alcurônio sobre a dissociação de $[^3\text{H}]$ -NMS, no receptor muscarínico M_2 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 $[^3\text{H}]$ -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 ela diminua a velocidade de dissociação do radioligante, como ilustrado na Figura 41(B). Esta situação foi observada para o efeito do alcurônio sobre a dissociação de $[^3\text{H}]$ -NMS, no receptor muscarínico M_2 humano (*apud* May e cols., 2004).

Como exemplo do nosso laboratório, apresentamos na Figura 42 o resultado de um ensaio que visava avaliar se o efeito inibidor que o

cumestano PCALC36 exercia sobre a ligação do [^3H]-flunitrazepam em sinaptosomas de cérebro de rato era fruto de um efeito alostérico negativo. Como o PCALC36 não alterou a cinética de dissociação do radioligante ortostérico, pudemos descartar uma interação alostérica entre o PCALC36 e o flunitrazepam, pelo menos no que diz respeito à cinética de dissociação (Lopes e cols., 2004).

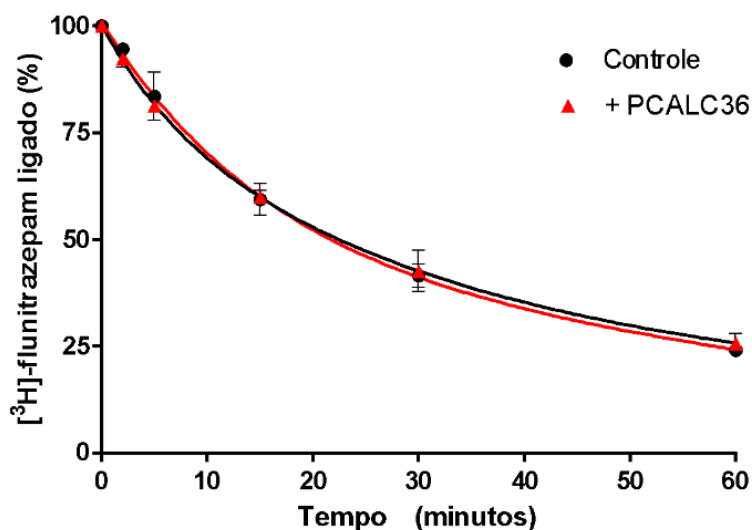


Figura 42. Influência do PCALC36 sobre a cinética de dissociação do [^3H]-flunitrazepam em sinaptosomas de rato. Após 90 min de incubação, a dissociação foi iniciada por diluição isotópica com 300 nM de flunitrazepam não marcado, sozinho (controle) ou na presença de 30 μM PCALC36. Adaptado de Lopes e cols., 2004.

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 devido a 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 M_4 humano, mas não de camundongo, por exemplo (Suratman e cols., 2011).

Ciente destas duas limitações, tivemos que abrir mão de diferentes protocolos de *binding* para tentar verificar se os resultados aparentemente conflitantes da nossa substância teste LASSBio-897 ao nível do receptor A_{2A} poderiam ser um artefato oriundo da diferença de espécie e sonda (*probe*) usadas nestes dois tipos de experimentos. De fato, o LASSBio-897 inibia a ligação de um radioligante agonista sintético ao receptor A_{2A} de estriado de rato mas aumentava a produção de AMPc induzida pela adenosina em células transfectadas com o receptor A_{2A} humano (Carvalho e cols., 2017). Primeiramente, mostramos que o LASSBio-897 inibia tanto a ligação de [3H]-adenosina ao receptor A_{2A} humano (Fig.43B) quanto a ligação do [3H]- CGS21680 ao receptor A_{2A} de rato (Fig.43A).



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 glutamatergico mGlu1 (Litschig e cols., 1999).

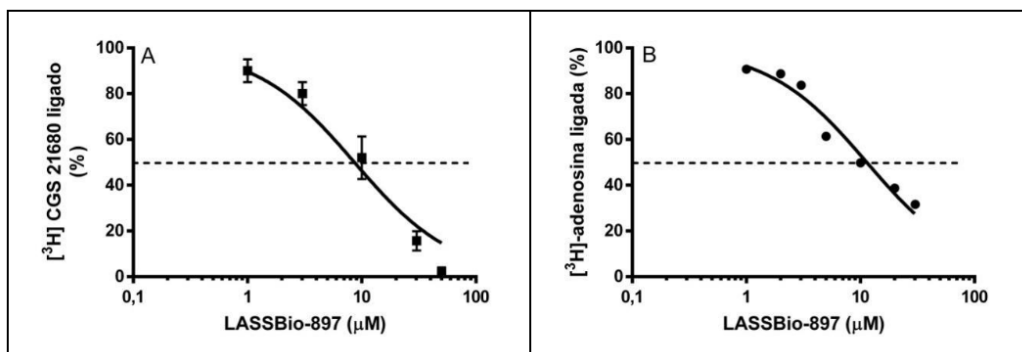


Figura 43. Curvas de competição do LASSBio-897 sobre a ligação de $[^3\text{H}]$ -CGS21680 em membranas estriadas de rato (A) e de $[^3\text{H}]$ -adenosina em uma preparação de membrana de receptores $\text{A}_{2\text{A}}$ humanos (B). Adaptado de Carvalho e cols., 2017.

Sem entrar em detalhes de outros protocolos de *binding* e de medição de AMPc, estes resultados nos ajudaram a elaborar uma proposta de mecanismo de ação molecular original para esta substância, como ilustrado na figura 44.

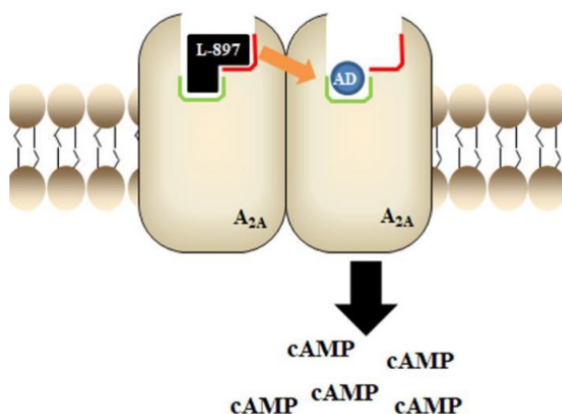


Figura 44. Esquema representando o duplo modo de interação ortostérico (verde)/alostérico (vermelho) proposto para o LASSBio-897 em um complexo dimérico de receptores $\text{A}_{2\text{A}}$, sendo capaz de se ligar de maneira bitópica a um protômero e exercer cooperatividade positiva para a ligação da adenosina ao outro protômero. AD, adenosina; L-897, LASSBio-897. Retirado de Carvalho e cols., 2017.

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).

Equação 10

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

Equação 11

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

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

Em farmacologia, a variação de entalpia (ΔH°) é geralmente interpretada como reflexo de forças intermoleculares entre o ligante e o receptor (sobretudo ligações de hidrogênio, interações de van de Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas), enquanto que a variação de entropia (ΔS°) reflete o rearranjo (desordem) das moléculas de água ou desdobramento da proteína. Como ilustrado no esquema da Figura 45, 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.

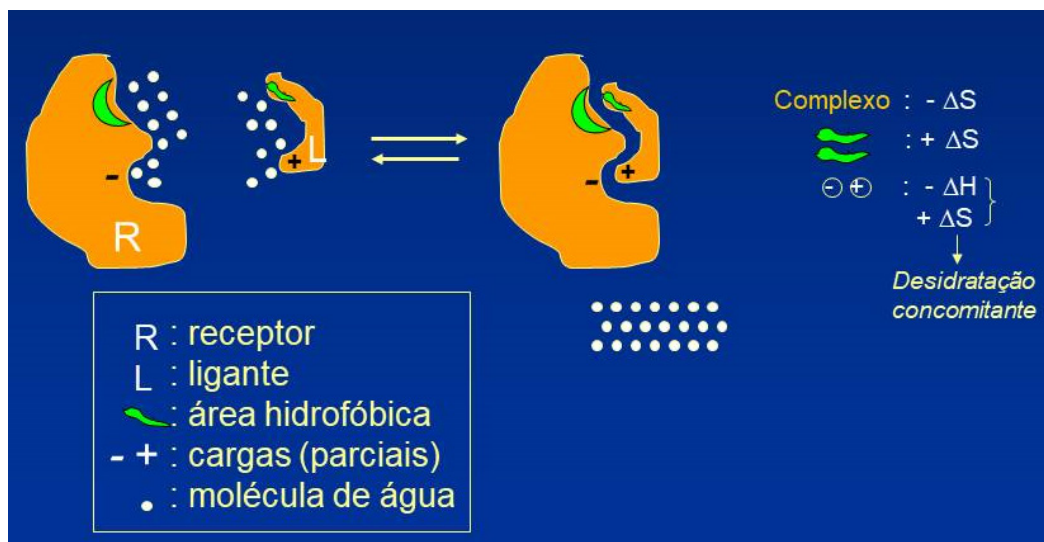
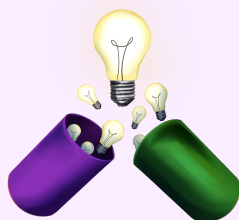


Figura 45. Eventos moleculares e termodinâmicos que determinam a ligação de fármacos a receptores. Adaptado de Testa e cols., 1987.



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. 46), baseado na equação do mesmo nome (Equação 12).

Equação 12

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

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

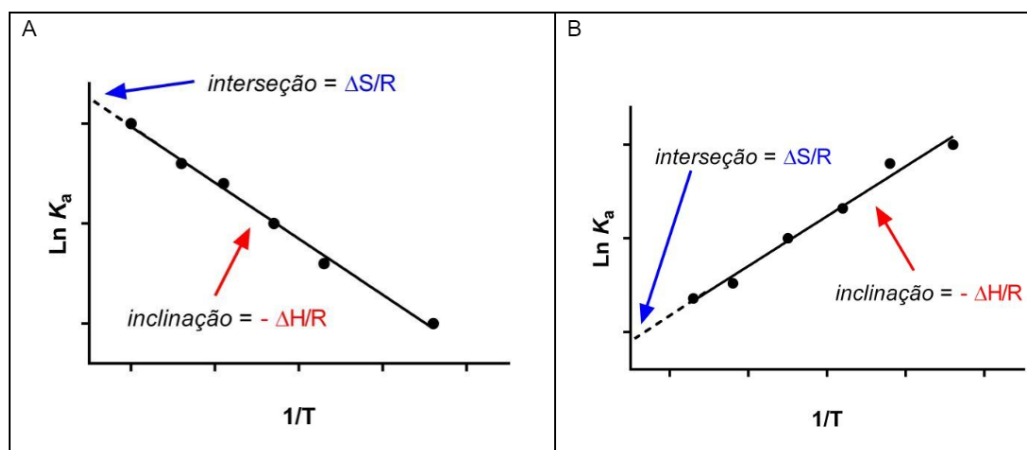
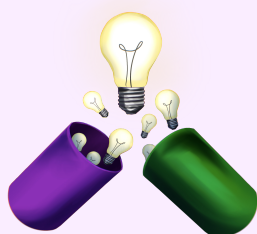


Figura 46. Gráficos de van't Hoff para determinação dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a formação do complexo fármaco-receptor. Exemplos teóricos para uma reação endotérmica (A: ΔH positivo) e uma reação exotérmica (B: ΔH negativo). Nota-se que o gráfico de van't Hoff é linear com base no 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). Em relação às medidas de *binding* em diferentes temperaturas e uso do gráfico de van't Hoff, a calorimetria de titulação isotérmica (vide [cap. 3.2.2.](#)) 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 (Claveria-Gimeno e cols., 2017). Por outro lado, esta técnica ainda é relativamente complexa para poder ser usada de rotina em processos de *screening* e é também sensível à presença de solvente como etanol e DMSO.

6.3.3. Aplicações

6.3.3.1. Descoberta de fármacos: enquanto a **otimização de protótipos** se fazia tradicionalmente aumentando a entropia da ligação (através do aumento de hidrofobicidade e rigidez do ligante), considera-se agora que a otimização entálpica de protótipos seria preferível à otimização entrópica *e.g.* para manutenção ou melhoria das propriedades farmacocinéticas (ADMET) (Claveria-Gimeno e cols., 2017).

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 verificada 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, estamos relatando o que fizemos para esclarecer a possível relação ortóloga que podia existir entre os sítios de ligação do $[^3\text{H}]\text{-PK11195}$ que detectamos no *Schistosoma mansoni* e os sítios de ligação presentes em rim de rato (receptor benzodiazepínico “periférico”). A Figura 47 nos permitiu verificar que a pequena população de receptores marcados com alta afinidade pelo $[^3\text{H}]\text{-PK111-95}$ 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 $[^3\text{H}]\text{-flunitrazepam}$ (Noël e cols., 2007).

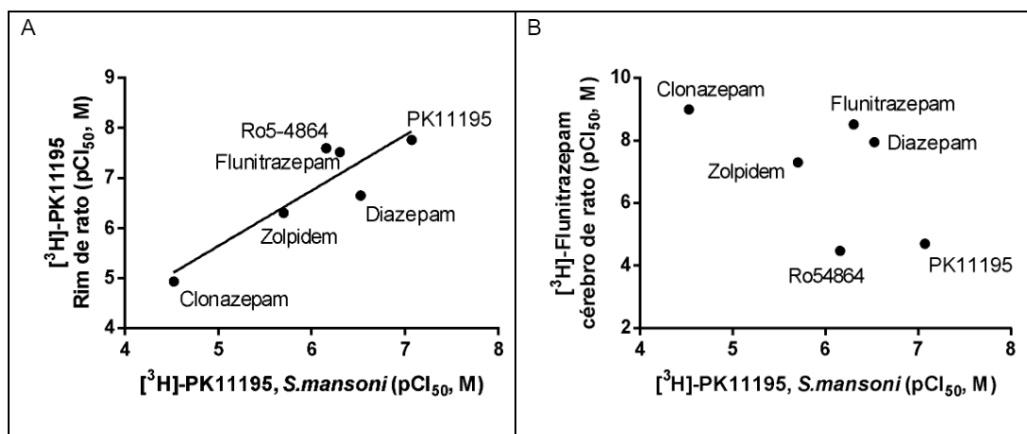
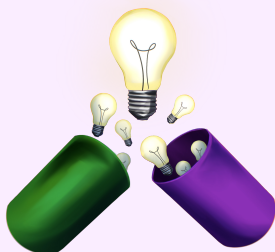


Figura 47. Perfil farmacológico dos sítios de ligação do [³H]-PK11195 no *Schistosoma mansoni*. A: comparação entre valores de pCl₅₀ obtidos em ensaios de competição usando-se [³H]-PK11195 para seis ligantes dos receptores benzodiazepínicos centrais ou periféricos, medidos em preparações de *S. mansoni* 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 pCl₅₀ 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 Cl₅₀)? 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 Cl₅₀. 2. Usar o teste paramétrico de Pearson para trabalhar com os valores de Cl₅₀ após terem sido transformados em logaritmos, usando-se, por exemplo, valores de pCl₅₀ (-logCl₅₀), para poder se beneficiar do maior poder deste teste paramétrico (como fizemos na Figura 47). No caso da Figura 37, 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 (Fig. 37 e Fig. 47), 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



Capítulo 7

Regressão não linear e ajuste de curvas

7.1. Ajuste de curvas: Princípio

Como preâmbulo, gostaríamos de citar esta sábia constatação geral sobre estatística proferida por Lang & Secic em 1997 (apud Drummond & Tom, 2012): *"É extremamente difícil explicar muitos conceitos estatísticos em termos que sejam tecnicamente precisos e facilmente compreendidos por aqueles com apenas um conhecimento superficial do tópico"*.

Desta forma, 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 alguns pesquisadores, gostaríamos de mencionar aqui duas referências que foram muito importantes para nós (Marino, 2014; Motulsky, 2014). Primeiramente, aconselhamos 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, muito usado no nosso meio. 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, como informa o autor de forma muito judiciosa!). 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 nós nos baseamos para este capítulo.

Queria também mencionar a disponibilidade de um vídeo da aula "Regressão não linear e análise de curva dose-efeito", que ministramos no Curso de BIOESTATÍSTICA APLICADA, oferecido durante o congresso da SBFTE, em Águas de Lindóia (2015): https://www.youtube.com/watch?v=S3MTY_QWE3o 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 ($Y_{\text{teórico}}$).

Equação 13

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

É desta forma que se alcança os melhores valores dos parâmetros de interesse, como coeficiente angular (a) e interseção 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 (Cp) vs. Tempo, para eliminação de fármacos (Farmacocinética) e gráfico de 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 de potência (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, a equação que considera 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 exemplo na [Figura 26](#)).

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 na [Figura 25](#).

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, indicamos a seguir quatro formas práticas que deveriam ser usadas rotineiramente, em conjunto, como ilustrado no exemplo teórico das Figuras 48 e 49:

1. Aspecto visual: apesar de subjetivo, esta avaliação não deveria ser subestimada. No caso do exemplo da Figura 48A, 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 $Y_{\text{teórico}} = 0$), como ilustrado na Figura 48 (B e C). 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 inadequadas ou não ótimas (vide comparação entre as Figuras 48 e 49) e não se pode simplesmente considerar o valor do parâmetro, sem as devidas reservas. A Figura 48 é um bom exemplo, já que apesar do ajuste visual ser satisfatório para a curva vermelha, a grande imprecisão do valor de CI_{50} indica que algo está errado, assim como os valores de topo e base, muito imprecisos e fora do esperado (100% e 0%, respectivamente) (vide comentários na legenda da Figura 48 e nova análise na Figura 49).

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.

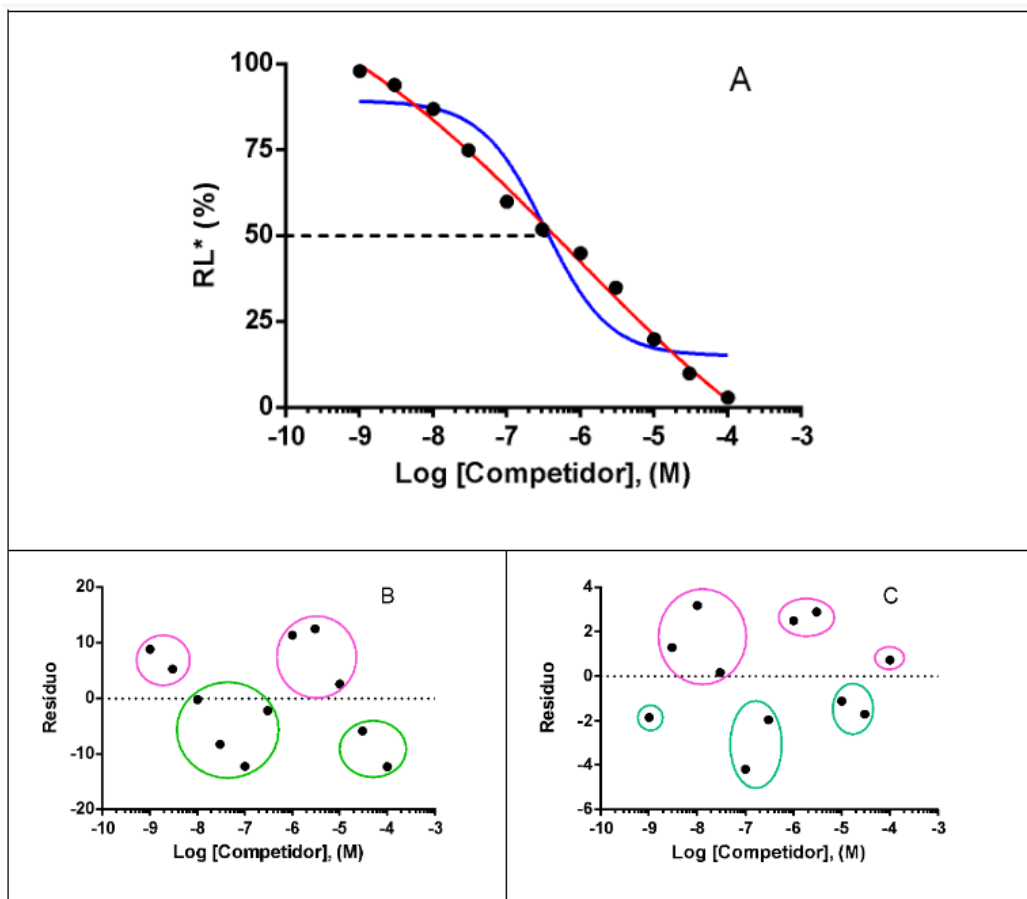


Figura 48. Análise de curva atípica de competição . A. Os dados teóricos foram analisados por regressão não linear (GraphPad Prism 6.01) comparando dois modelos: o modelo simples (curva azul, vide [Equação 7](#)) e o modelo de Hill (curva vermelha, vide [Capítulo 5.2.2.2.](#)), sem fixar os valores de “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). O coeficiente de Hill foi bem inferior a 1 ($n_H = -0,210 \pm 0,092$). Porém, nota-se que o valor do CI_{50} ($0,75 \mu M$) é muito impreciso ($IC_{95\%}$: $0,059 - 9,6 \mu M$) e que o valor da “Base” é inferior a zero ($Bottom = -45,6 \pm 41,0\%$) e o valor do “Topo” é bem superior a 100% ($Top = 136 \pm 30\%$). 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, o que não significa que seja o modelo ideal para análise destes dados.

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 μ 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. 49). 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 ($p < 0,05$). Por outro lado, não há desvio do modelo de Hill ($p > 0,05$).

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 25 ([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 ($CI_{50} = 30$ nM) e 50% de sítios de baixa afinidade ($CI_{50} = 7$ μ M).

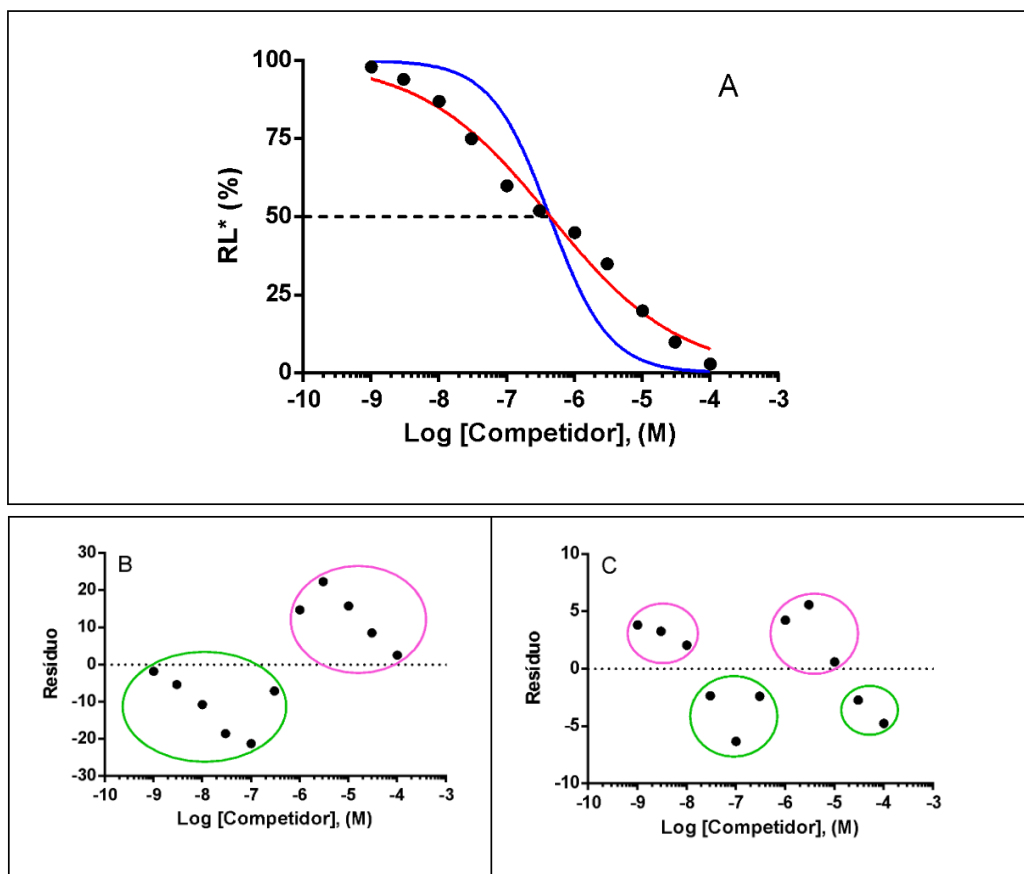


Figura 49. Análise de curva atípica de competição . A. Os dados da figura 48 foram analisados por regressão não linear (GraphPad Prism 6.01) comparando os mesmos dois modelos (o modelo simples: curva azul, [Equação 7](#); e o modelo de Hill: curva vermelha, vide [Capítulo 5.2.2.2.](#)), porém desta vez 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: $CI_{50} = 0,44 \mu\text{M}$ ($IC_{95\%}$: $0,30 - 0,64 \mu\text{M}$) e coeficiente de Hill (n_H) = $-0,457 \pm 0,033$.

Provérbio Tibetano



Capítulo 8

Análise estatística e apresentação dos parâmetros

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 define o efeito máximo (E_{max} , B_{max} , etc) e a constante (ou parâmetro) que define a afinidade/potência (K_d , K_i , CE_{50} , CI_{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 tratado) 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. K_d , K_i , CE_{50} , CI_{50}

Como preâmbulo, achamos importante esclarecer a diferença entre constantes (como K_d e K_i) e parâmetros (como CE_{50} e CI_{50}), como fizemos na [27ª matéria do glossário semântico de farmacologia](#) que tratou deste tema. De forma simplificada, podemos considerar que uma constante é uma quantidade que tem o mesmo valor em todas as situações, enquanto que um parâmetro é uma quantidade cuja constância depende da situação particular, isto é, sob condições experimentais diferentes, um parâmetro pode apresentar valores diferentes.

O cálculo de médias para estas constantes e parâmetros de afinidade e potência, respectivamente, é mais complicado, pois estes obedecem a uma distribuição log-normal (Kenakin, 2009). Assim sendo, podemos escolher entre as seguintes opções para expressar suas médias:

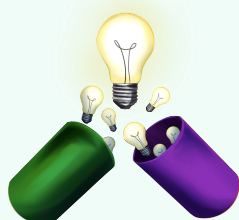
1. Apresentar os resultados como médias aritméticas dos valores transformados em logaritmos (\pm E.P.M.). Nota-se que é mais comum, em farmacologia, usar os valores de “-log” para evitar sinal negativo. Assim, no caso de K_i , por exemplo, usa-se os valores de pK_i ($-\log K_i$);

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 $[^3H]$ -8-OH-DPAT e $[^3H]$ -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) |
|--------------------|------------------------|-----------------------------------|
| $[^3H]$ -8-OH-DPAT | 0,68 (0,47 – 0,98) | 114 \pm 11 |
| $[^3H]$ -p-MPPF | 0,74 (0,40 – 1,4) | 119 \pm 16 |

Neste caso (constantes de afinidade e parâmetros de potência), os testes estatísticos paramétricos usados para determinar a significância das diferenças entre grupos (por exemplo, controle e tratado) 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,

do *software* 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, apesar de que os puristas podem “torcer o nariz” pelo fato de que não seria correto fazer médias de parâmetros (em vez de medidas).

9 Capítulo 9

Portfólio de ensaios do LBFM

“Os progressos da ciência obedecem à lei da repulsão: para dar um passo em frente, é preciso começar por derrubar o domínio do erro e das falsas teorias”.

Boris Pasternak



Capítulo 9

Portfólio de ensaios do LBFM

9.1. Introdução

Ciente da necessidade de desenvolver *know-how* em planejamento e descoberta de novos fármacos no país, começamos em 1997 uma colaboração interdisciplinar, inicialmente com farmacêuticos e químicos do próprio CCS-UFRJ (LASSBio/Faculdade de Farmácia; LQB/IPPN), visando a descoberta de novos **protótipos** que pudessem ser levados até a condição 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 nossa participação em projetos interdisciplinares de descoberta e desenvolvimento acadêmico de fármacos, iniciado no PRONEX de 1997 (*Desenvolvimento de Fármacos: Química, Farmacologia e Toxicologia*) e depois no Instituto do Milênio (Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos - 2005) e no INCT (INCT de Fármacos e Medicamentos - INOFAR, 2008 e 2014), fomos estimulados 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 (*uma substância é agonista (pleno ou parcial)*), antagonista ou agonista inverso?), *e.g.*, para receptores metabotrópicos. No decorrer desta trajetória, tivemos também condições de elaborar ensaios cinéticos de *binding* para verificar a hipótese de efeito alostérico (cap.5.2.3.2.; Pôças e cols., 2003) ou para estimar o tempo de residência no receptor (drug-target residence time) (cap. 5.3.2.; Pompeu e cols., 2015).

Mais recentemente, validamos um primeiro ensaio para avaliar inibidores

de sistemas de captação (*uptake*), em função de um projeto visando a descoberta de inibidores de transportador de glicina (da Silva e cols., 2020).

9.2. Acessibilidade

O arquivo em pdf de versão mais completa deste portfólio, contendo também descrição de quatro ensaios de inibição enzimática e dois ensaios funcionais, sendo um em órgão isolado e outro *in vivo*, 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

Dentro do escopo deste e-book, reproduzimos abaixo a lista dos ensaios de *binding* que já foram validados no laboratório ao longo dos anos e usados em projetos de descoberta de novos fármacos, inclusive na modalidade de prestação de serviço, ou de cunho mais básico.

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

RF binding funcional*: ensaio que permite determinar a atividade intrínseca de forma qualitativa (uma substância 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 a rianodina: [^3H]-Rianodina | R8 |
| Dopamina (D_1): [^3H]-SCH 23390 | R9 |
| Dopamina ($\text{D}_{2\text{-like}}$): [^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/ M_1): [^3H]-QNB | R16 |
| Serotonina ($5\text{-HT}_{1\text{A}}$ - Agonista): [^3H]-8OH-DPAT | R17 |
| Serotonina ($5\text{-HT}_{1\text{A}}$ - Antagonista): [^3H]-pMPPF | R18F* |
| <i>[^3H]-pMPPF (GTP-shift)</i> | R18F* |
| Serotonina ($5\text{-HT}_{2\text{A}}$): [^3H]-cetanserina | R19 |
| <i>[^3H]-cetanserina (GTP-shift)</i> | R19F* |
| Serotonina ($5\text{-HT}_{2\text{C}}$ - Antagonista): [^3H]-Mesulergina / células transfectadas | R20 |
| Serotonina (5-HT_7 - Antagonista): [^3H]-SB269970 / células transfectadas | R21 |

Como exemplo de apresentação dos ensaios no nosso portfolio, reproduzimos 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

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

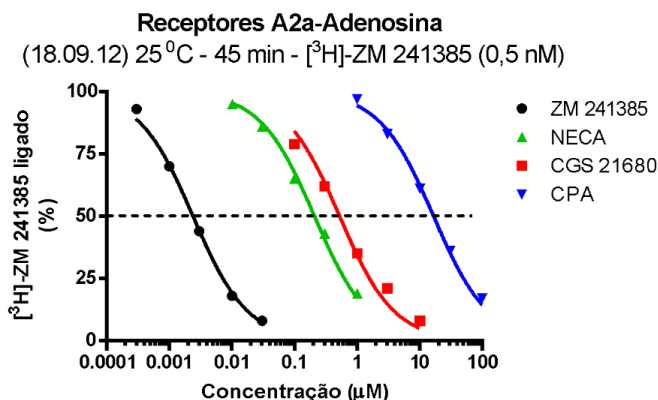
$$\text{Cálculo do } K_i = \text{CI}_{50} / 1,36 \quad (\text{nM})$$

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}; K_d 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: efeito anti-inflamatório de interesse para o tratamento de doenças pulmonares (asma/DPOC), hipotensor 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)

10

Capítulo 10

Referências

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

Albert Einstein



10

Capítulo 10

Referências

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.

Azalim P., do Monte F.M., Rendeiro M.M., Liu X., O'Doherty G.A., Fontes C.F., Leitão S.G., Quintas L.E.M., Noël F. Conformational states of the pig kidney Na⁺/K⁺-ATPase differently affect bufadienolides and cardenolides: a directed structure-activity and structure-kinetics study. *Biochem. Pharmacol.* 171:113679, 2020

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.

Berg E.L. The future of phenotypic drug discovery. *Cell Chem. Biol.* 28(3):424-430, 2021.

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.

Bissaro M., Bolcato G., Deganutti G., Sturlese M., Moro S. Revisiting the allosteric regulation of sodium cation on the binding of adenosine at the human A_{2A} adenosine receptor: Insights from supervised molecular dynamics (SuMD) simulations. *Molecules* 24(15):2752, 2019.

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.

Blass B.E. Chapter 1 - Drug discovery and development: An overview of modern methods and principles. Pp.1-34. In: Basic Principles of Drug Discovery and Development. ISBN 978-0-12-411508-8, Elsevier Inc., 2015.

Blass B.E. Chapter 4 – In vitro screening systems. Pp. 143-202. In: Basic Principles of Drug Discovery and Development. ISBN 978-0-12-411508-8, Elsevier Inc., 2015.

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.

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.

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.* 14:1899-1912, 2014.

Bylund D.B., Enna S.J. Receptor binding assays and drug discovery. *Adv. Pharmacol.* 82:21-34, 2018.

Bylund D.B., Toews M.L. Quantitative versus qualitative data: the numerical dimensions of drug action. *Biochem. Pharmacol.* 87:25-39, 2014.

Carvalho V.F., Ferreira T.P.T., de Arantes A.C.S., Noël F., Tesch R., Sant'Anna C.M.R., Barreiro E.J.L., Fraga C.A.M., Rodrigues e Silva P.M., Martins M.A. LASSBio-897 Reduces lung injury induced by silica particles in mice: Potential interaction with the A_{2A} receptor. *Front. Pharmacol.* 8:778, 2017.

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.

Claveria-Gimeno R., Veja S., Abian O., Velazquez-Campoy A. A Look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 12(4):363-377, 2017.

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. Evolution of the drug-target residence time model. *Expert Opin. Drug Discov.* 16: 1441-1451, 2021.

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.

Cunha V.M.N., Meyer-Fernandes J.R., Noël F. A (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from *Schistosoma mansoni* is coupled to an active transport of calcium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52:167-174, 1992.

da Silva V.D., Silva R.R., Neto J.G., Lopez-Corcuera B., Guimarães M.Z., Noël F., Buarque C.D. New α -hydroxy-1,2,3-triazoles and 9H-fluorenes-1,2,3-triazoles: Synthesis and evaluation as glycine transporter 1 inhibitors. *J. Braz. Chem. Soc.* 31(6):1258-1269, 2020

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 α -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.

Dorsey B.D., Levin R.B., McDaniel S.L., Vacca J.P., Guare J.P., Darke P.L., Zugay J.A., Emini E.A., Schleif W.A., Quintero J.C., Lin J.H., Chen I-W., Holloway M.K., Fitzgerald P.M.D., Axel M.G., Ostovic D., Anderson P.S. Huff J.R. L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.* 37(21):3443-3451, 1994.

Drummond G.B., Tom B.D. Presenting data: can you follow a recipe? *Brit. J. Pharmacol.* 165:777-781, 2012.

Duarte D.A., Parreiras-e-Silva L.T., Oliveira E.B., Bouvier M., Claudio M. Costa-Neto C.M. Angiotensin II type 1 receptor tachyphylaxis is defined by agonist residence time. *Hypertension* 79(1):115-125, 2022.

Eder J., Sedrani R., Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13(8):577-587, 2014.

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.

Erlanson D.A., Fesik S.W., Hubbard R.E., Jahnke W., Jhoti H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15:605-619, 2016.

Fang Y. Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 7:969-988, 2012.

Georgi V., Dubrovskiy A., Steigele S., Fernández-Montalván A.E. Considerations for improved performance of competition association assays analysed with the Motulsky–Mahan's “kinetics of competitive binding” model. *Br. J. Pharmacol.* 176:4731-4744, 2019.

Gessi S., Fogli E., Sacchetto V., Varani K., Merighi S., Leung E., Lennan S.M., Borea P.A. Thermodynamics of A2B adenosine receptor binding discriminates agonistic from antagonistic behavior. *Biochem. Pharmacol.* 75:562-569, 2008.

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 A.P., Heitman L.H. Functional efficacy of adenosine A2A receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br. J. Pharmacol.* 166:1846-1859, 2012.

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.* 18:309-320, 2013.

Haber V.E., Spaventi R. Discovery and development of novel drugs. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 55: 91-104, 2017.

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.

Haskell-Luevano C., Meanwell, N.A. Allosteric Modulators of Drug Targets. *J. Med. Chem.* 62:1-2, 2019.

Herenbrink C.K., Sykes D.A., Donthamsetti P., Canals M., Coudrat T., Shonberg J., Scammells P.J., Capuano B., Sexton P.M., Steven J. Charlton S.J., Javitch J.A., Christopoulos A., Lane J.R. The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nat. Commun.* 7:10842, 2016.

Hill A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemo-

globin on its dissociation curves. *J. Physiol. Suppl.* 40:iv-vii, 1910.

Ioannidis J.P. Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2:e124, 2005.

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. USA* 98:3577-3582, 2001.

Jerabek-Willemsen M., André T., Randy Wanner R., Roth H.M., Duhr S., Baaske P., Breitsprecher D. MicroScale thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Structure* 1077:101-113, 2014.

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, 3ª edição, 2009.

Kenakin T. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. *Br. J. Pharmacol.* 168:554-575, 2013.

Kenakin T. Emergent concepts of receptor pharmacology. *Handb. Exp. Pharmacol.* 260:17-41, 2019.

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 β -adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 457:1-39, 1976.

Lefkowitz R.J., Mukherjee C., Coverstone M., Caron M.G. Stereospecific [^3H] (–)-alprenolol binding sites, β -adrenergic receptors and adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 60(2):703-709, 1974.

Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosens. Bioelectron.* 10: i-ix, 1995.

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-AT-Pase 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-cala-bash-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.

Markham A. Oliceridine: First approval. *Drugs* 80(16):1739-1744, 2020.

Maveyraud L., Mourey L. Protein X-ray crystallography and drug discovery. *Molecules* 25(5): 1030, 2020.

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 [^{35}S]GTP γ S 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, 3ª 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.

Neves G., Menegatti R., Antonio C.B., Graziottin L.R., Vieira R.O., Rates S.M.K., Noël F., Barreiro E.J., Fraga C.A.M. Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D₂-like and 5-HT_{1A} receptors. *Bioorg. Med. Chem* 18:1925-1935, 2010.

Noël F. Cap.1. Introdução à Farmacologia: Aspectos Históricos (P.3-12) em: Farmacologia. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos (ed.), ATHENEU, Rio de Janeiro, 2020.

Noël F., Azalim P., do Monte F.M., Quintas L.E.M., Katz A., Karlsh S.J.D. Revisiting the binding kinetics and inhibitory potency of cardiac glycosides on Na⁺,K⁺-ATPase (α 1 β 1): methodological considerations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 94(2):64-72, 2018.

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.

Noël 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 α2 isoform of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. Pharmacol.* 55:1531-1535, 1998.

Noël F., Xexéo G. Screener: Jogo Educacional para o Ensino do Processo de Descoberta e Desenvolvimento de Fármacos. Rio de Janeiro, edição dos autores, 2021. ISBN: 978-65-00-29402-6.

Noël F., Xexéo G., Mangeli E., Mothé A., Marques P., Kritz J., Blanchard F., Vermelho H. de Paiva B. SCREENER, an educational game for teaching the drug discovery and development process. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 54(12):e11786, 2021

Odagaki Y., Toyoshima R. 5-HT_{1A} receptor agonist properties of antipsychotics determined by [35S]GTPγS binding in rat hippocampal membranes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34:462-466, 2007.

Paketuryte V., Zubriene A, Ladbury J.E. Matulis D. Intrinsic Thermodynamics of Protein-Ligand Binding by Isothermal Titration Calorimetry as Aid to Drug Design. *Methods Mol. Biol.* 1964: 61-74, 2019.

Paton W.D., Rang H.P. The uptake of atropine and related drugs by intes-

tinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 163:1-44, 1965.

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:203-214, 2010.

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.

Pedreira J.G.B., Silva R.R., Noël F.G., Barreiro E.J. Effect of S–Se bioisosteric exchange on affinity and intrinsic efficacy of novel N-acylhydrazone derivatives at the adenosine A_{2A} receptor. *Molecules* 26:7364, 2021.

Pert C.B. & Snyder S.H. Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014, 1973.

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., Alves F.R., Figueiredo C.D., Antonio C.B., Herzfeldt V., Moura B.C., Rates S.M.K., Barreiro E.J., Fraga C.A.M., Noël F. Synthesis and pharmacological evaluation of new N-phenylpiperazine derivatives designed as homologues of the antipsychotic lead compound LASSBio-579. *Eur. J. Med. Chem.* 66:122-134, 2013.

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.

Quaresma B.M.C.S., Pimenta A.R., da Silva A.C., Pupo A.S., Romeiro L.A.S., Silva C.L.M., Noël F. Revisiting the pharmacodynamics uroselectivity of α 1-adrenergic receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 371:106-112, 2019.

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 defe-

rens. *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 β_2 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., Skiniotis 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.

Raviña E. Structure-based drug discovery. In: Raviña E, ed. *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*. Weinheim: Wiley-VCH; 2011:405-440.

Roth B.L., Sheffler D.J., Kroeze W.K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. 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.

Silva RR, Parreiras-e-Silva LT, Pompeu TET, Duarte DA, Fraga CAM, Barreiro EJ, Menegatti R, Costa-Neto CM and Noël F (2019) Evaluation of functional selectivity of haloperidol, clozapine, and LASSBio-579, an experimental compound with antipsychotic-like actions in rodents, at G protein and arrestin signaling downstream of the dopamine D2 receptor. *Front. Pharmacol.* 10:628, 2019.

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.* 24:351-357, 1979.

Stephenson R. A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.* 11:379-393, 1956.

Stoddart L.A., White C.W., Nguyen K., Hill S.J., Pflieger K.D.G.. Fluorescence- and bioluminescence-based approaches to study GPCR ligand binding. *Br. J. Pharmacol.* 173(20):3028-3037, 2016.

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. & Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* 10: 507–519, 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.

Swinney D.C. & Lee J.A. Recent advances in phenotypic drug discovery. F1000Res. 2020 Aug 7;9:F1000 Faculty Rev-944.

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.

Van Drie J.H., Tong L. Cryo-EM as a powerful tool for drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 30:127524, 2020.

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 GABAA 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., 12ª edição, 2012.

Ward W.H., Holdgate G.A. Isothermal titration calorimetry in drug discovery. *Prog. Med. Chem.* 38:309-376, 2001.

Weiland G.A., Minneman K.P., Molinoff P.B. Fundamental difference between the molecular interactions of agonists and antagonists with the β -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 H₁-receptor. *Mol. Pharmacol.* 76:25-37, 2009.

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

Autor

François Germain Noël



Possui graduação em Ciências Farmacêuticas (1978) e Doutorado em Ciências Farmacêuticas-Farmacologia (1982) pela Université Catholique de Louvain, Bélgica. Professor Titular concursado da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Programa de Farmacologia / ICB, desde 2004). Fez pesquisa na área de Farmacologia, com ênfase em Farmacologia Bioquímica e Molecular, tendo atuado principalmente nos seguintes temas: Na^+ , K^+ -ATPase, Esquizofrenia, Hiperplasia Prostática

Benigna, Interação fármaco-receptor (*e.g.*, *binding*) e descoberto de novos protótipos, com depósito de pedidos de patentes internacionais e um licenciamento para empresa privado de desenvolvimento de produtos. Teve alguma experiência em Farmacocinética clínica (Bioequivalência e PK/PD, na época em que era Investigador Principal do Centro de Bioequivalência da Faculdade de Farmácia, UFRJ). Foi Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFRJ (Farmacologia e Terapêutica Experimental: 1990-1996; Farmacologia e Química medicinal: 2009-2010). Eleito membro (2012-2014) e Presidente (2015-2017) do Conselho Deliberativo da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). Participa ativamente das iniciativas educacionais da SBFTE, sendo membro titular da comissão e responsável pela temática de “Princípios gerais”, pelo glossário semântico de farmacológico (contribuiu com 30 matérias) e tendo sido coautor do jogo educacional SCREENER (www.screener.com.br). Coordenador do SIG Farmaco (grupo de interesse especial em Farmacologia e Terapêutica da Rede RUTE de Telemedicina) na UFRJ.

CV-LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5962306335524096>

Ilustradora

Aimêe "Sarang" Mothé



Aimêe Mothé, também conhecida como Sarang, é uma ilustradora e desenvolvedora de jogos do Rio de Janeiro. Estudante do curso Comunicação Visual Design, da Escola de Belas Artes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e bolsista PIBIC, trabalhou como artista e designer no jogo Screener, jogo educacional sobre descoberta e desenvolvimento de fármacos idealizado pelo professor François e chancelado pela SBFTE em 2021.

Também faz parte da gestão do grupo de desenvolvimento de jogos da UFRJ, a GDP. Teve a oportunidade de participar da produção de diversos jogos e de projetos como o Laboratório de Aprendizado de Jogos Eletrônicos (ou a LAJE, para os mais íntimos) cujo objetivo é ensinar o desenvolvimento de um jogo digital de forma gratuita através de palestras, mentorias e tarefas práticas para jovens do Rio de Janeiro, mas também criando uma base de conteúdo rica e descomplicada para qualquer pessoa que tenha interesse em criar seu primeiro jogo, mas não sabe usar as ferramentas necessárias.

Além disso, foi designer e ilustradora do livro GDPânico, uma coletânea de contos de halloween, lançado em outubro de 2020 junto de talentosos artistas e escritores membros da GDP-UFRJ.

Além de seus trabalhos comerciais, sua arte envolve uma amálgama de diferentes estilos que mudam de tempos em tempos, mas que acabam sempre revolvendo em torno de ossos, corpos, retratos e mãos.

Acredita que a arte não precisa mudar o mundo, basta mudar as pessoas, um sentimento por vez.

Site: Artofsarang.com

Instagram: [instagram.com/artof.sarang/](https://www.instagram.com/artof.sarang/)

SBFTE – Iniciativas Educacionais

(SBFTE – Education Initiatives)



Construindo Divulgação e Educação
Científica em Farmacologia e
Terapêutica Experimental

(Building on Scientific Information
and Education in Pharmacology and
Experimental Therapeutics)

Informações e contato para envio de materiais:
(contact information for material contributions)
iniciativaseducacionais.sbfte@gmail.com

***Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica
Experimental (SBFTE)***

www.sbfte.org.br

Email: sbfte@sbfte.org.br

Este material foi disponibilizado pelo autor para integrar o
portfólio de materiais divulgados na página online e mídias sociais
de conteúdos das Iniciativas Educacionais da SBFTE.

O conteúdo é da responsabilidade do autor.

Copyright_SBFTE_2020

“É uma Jornada incrível pelo mundo da Farmacologia quantitativa. Nessa segunda edição, o autor, com o auxílio de sua aluna Aimêe (Sarang) Mothé, ilustra de forma lúdica, as principais mensagens de cada capítulo. Essa mistura, de ciência e arte, deu um toque fantástico para o novo livro. É possível enxergar nitidamente, em cada parágrafo, a paixão do autor pela ciência dos receptores e a delicadeza da aluna na confecção das ilustrações.”

Thiago Mattar Cunha

Professor Associado da USP-RP
Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de
Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE)

“Continua o movimento de ampliação dos círculos concêntricos em torno de nosso microuniverso do laboratório. Cada um de nós cientistas cresce de alcance e influência. O movimento de popularização e difusão da Ciência agora segue enriquecido com mais uma obra exemplar nesse caminho de ampliação de horizontes.”

Roberto Lent

Professor Emérito do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ
Pesquisador do Instituto D’Or de Ensino e Pesquisa



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

