



Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular

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

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

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

FONE/FAX: +55 (21) 2562-6732

E-mail: fnoel@pharma.ufrj.br

HomePage: <http://www.farmac.ufrj.br/laboratorios/lfbm/home.htm>

Setor de *Screening* Farmacológico

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

Atualizado em Março de 2011

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

1. APRESENTAÇÃO

A descoberta de novos fármacos baseia-se na avaliação da atividade biológica (*screening farmacológico*) de novas substâncias sintéticas e de produtos naturais. Pressionada pela velocidade com a qual novas moléculas são sintetizadas através da química combinatória, a grande indústria farmacêutica, assim como pequenas firmas especializadas como a CEREP/França, desenvolveram técnicas robotizadas, sobretudo baseadas em ensaios de ligação com radioligantes, para assegurar um *screening* suficientemente rápido (*High Throughput Screening*). Além de excessivamente caro para a realidade acadêmica, este tipo de *screening* simplificado apresenta falhas potenciais, sobretudo falsos negativos, o que pode ocorrer com maior frequência no caso de receptores ionotrópicos que possuem vários sítios moduladores (Noël, F. e cols., *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 51: 169-173, 2001). Tal situação pode ser particularmente prejudicial quando o número de substâncias a serem testadas é relativamente pequeno como no caso de moléculas desenhadas racionalmente, que seja por técnicas de modelagem molecular fundamentadas na estrutura tridimensional do receptor ou por bio-isomerismo por exemplo (Barreiro, EJ & Fraga, CAM "*Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*", ArtMed, Porto Alegre, 2008 – 2ª Edição).

Ciente da necessidade de desenvolver *know-how* em planejamento e desenvolvimento de novos fármacos no país, iniciamos, em 1997, uma colaboração interdisciplinar, inicialmente com químicos do próprio CCS-UFRJ, visando o desenvolvimento de novos candidatos à fármacos. Tendo uma certa tradição no uso da técnica de *binding* para estudar a interação fármaco-receptor, nosso laboratório optou por desenvolver ensaios com desenho cuidadoso para compensar a baixa produtividade (velocidade) por um maior grau de performance (maior probabilidade de descobrir uma atividade biológica) e por disponibilizar uma alternativa no país, sem necessidade de excessiva burocracia e com possibilidade de discutir protocolos e resultados, de forma personalizada.

Em função deste tipo de projeto, tivemos participação no depósito de duas patentes internacionais (PCT Application Number PCT/US00/17024 : "*Thienylhydrazone with digitalis-like properties (positive inotropic effects)*") e "*Use of Adrenergic N-Phenylpiperazine Antagonists, Pharmaceutical Compositions Containing Them, and Methods of Preparing Them*" (USPTO: 20070219213)" além de patentes nacionais (INPI) e em diferentes artigos científicos na área fronteira entre Química medicinal e Farmacologia (vide CV-LATTES do Coordenador, Prof. F. Noël em: <http://lattes.cnpq.br/596>).

2. EQUIPE

2.1. RESPONSÁVEL

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

2.2. DOCENTES

Dr. François Noël, responsável

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

2.3. TÉCNICOS

A execução dos ensaios é realizada por técnico, ou aluno de Pós-graduação, especialmente treinados pelo docente responsável.

O relatório é preparado pelo técnico responsável pelo ensaio e revisado pelo docente responsável pelo Setor de *Screening*.

3. CATÁLOGO DE ENSAIOS

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

* binding funcionais são ensaios que permitem determinar a eficácia intrínseca de forma qualitativa (um composto é agonista, antagonista ou agonista inverso?)

	Código
[³ H]-Flunitrazepam (receptor benzodiazepínico central)	R1
<i>[³H]-Flunitrazepam (GABA-shift)</i>	<i>R1F*</i>
[³ H]-PK11195 (receptor benzodiazepínico periférico)	R2
[³ H]-PN200-110 (canal de cálcio voltagem-dependente)	R3
[³ H]-Rianodina (canal de cálcio sensível à rianodina)	R4
[³ H]-KA (receptor glutamatérgico ionotrópico: tipo cainato)	R5
[³ H]-AMPA (receptor glutamatérgico ionotrópico: tipo AMPA)	R6
[³ H]-MK-801 (receptor glutamatérgico ionotrópico: tipo NMDA)	R7
[³ H]-prazosina (receptor α_1 adrenérgico: α_{1B})	R8
[³ H]-prazosina (receptor α_1 adrenérgico: α_{1A})	R9
[³ H]-RX 821002 (receptor α_2 adrenérgico)	R10
[³ H]-ketanserina (receptor serotoninérgico: tipo 5-HT _{2A})	R11
<i>[³H]-ketanserina (GTP-shift)</i>	<i>R11F*</i>
[³ H]-8OH-DPAT (receptor serotoninérgico: tipo 5-HT _{1A} - Agonista)	R12
[³ H]-MPPA (receptor serotoninérgico: tipo 5-HT _{1A} - Antagonista)	R13
<i>Rec. 5-HT_{1A} (razão dos K_i para radioligante antagonista e agonista)</i>	<i>R14F*</i>
[³ H]-Mesulergine / células transfectadas (receptor serotoninérgico: tipo 5-HT _{2C})	R15
[³ H]-YM-09151-2 (receptor dopaminérgico: tipo D ₂ -like)	R16
[³ H]-YM-09151-2 / células transfectadas (receptor dopaminérgico: tipo D ₄)	R17
[³ H]-QNB (receptor muscarínico: não seletivo/M1)	R18

3.2. Enzimas – Atividade enzimática (E)

	Código
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	E1
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	E2
Ca ²⁺ -ATPase (SERCA)	E3

3.3. Estudos funcionais (F)

	Código
Atividade contraturante ou relaxante no músculo liso vascular	F1
Atividade contraturante no <i>Schistosoma mansoni</i>	F2
Atividade esquistosomicida <i>in vitro</i> (<i>Schistosoma mansoni</i>)	F3

Receptor benzodiazepínico central

Número de catálogo: R1

Código de preço:

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

Ligante: [³H]-Flunitrazepam (0,2 nM)

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

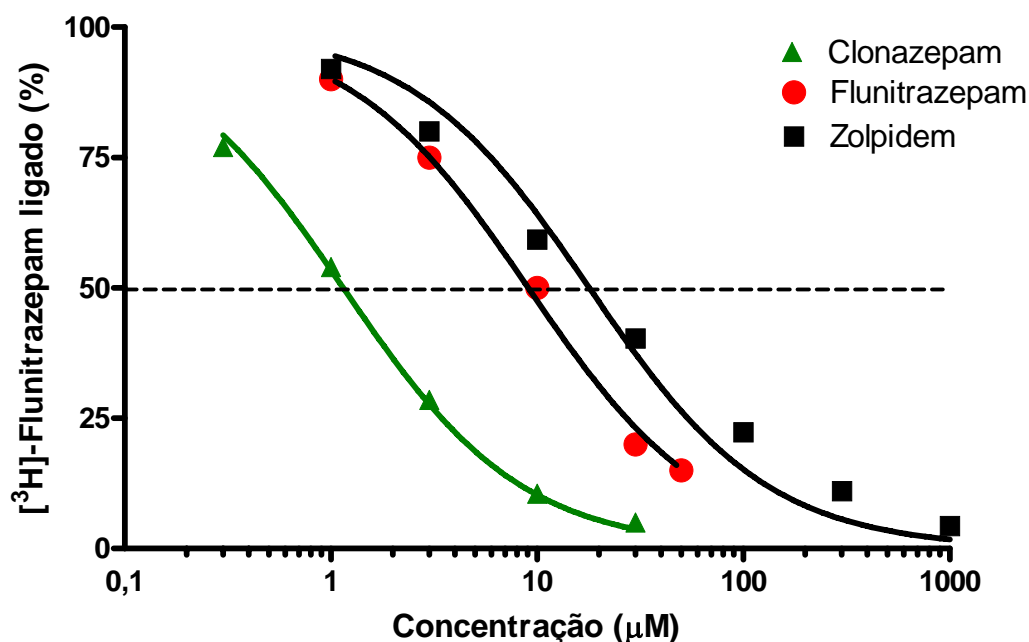
$Kd = 2,7 \pm 0,1 \text{ nM}$

Cálculo do $Ki = CI_{50} / 0,93$ (nM)

Não-específico: Flunitrazepam (50 μM)

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

Referência: *Eur. J. Pharmacol.* 495: 87-96, 2004; *Parasitology* 134: 1003-1012, 2007



Relevância: O receptor $GABA_A$ é o maior responsável pelo efeito inibitório pós-sináptico no sistema nervoso central de mamíferos. Este receptor exibe sítios de ligação para o GABA, neurotransmissor fisiológico que abre o canal de cloreto, e sítios moduladores, um dos quais liga as benzodiazepinas (BZP). Os agonistas para este sítio BZP, como o flunitrazepam, são usados clinicamente como sedativo-hipnótico, ansiolítico, relaxante muscular e/ou anticonvulsivante. Os antagonistas (como o flumazemil) são usados no tratamento de intoxicação com os agonistas. Agonistas inversos seletivos para algum sub-tipo de receptor (ex. Contendo sub-unidade α_5) poderiam ser úteis como para aumentar a cognição.

Nesta preparação bruta (não lavada, portanto contendo GABA endógeno), pode-se detectar o efeito inibidor dos antagonistas no sítio do GABA (ex: bicuculina).

Receptor benzodiazepínico central: ensaio para determinação da eficácia intrínseca

Número de catálogo: R1F*

Código de preço:

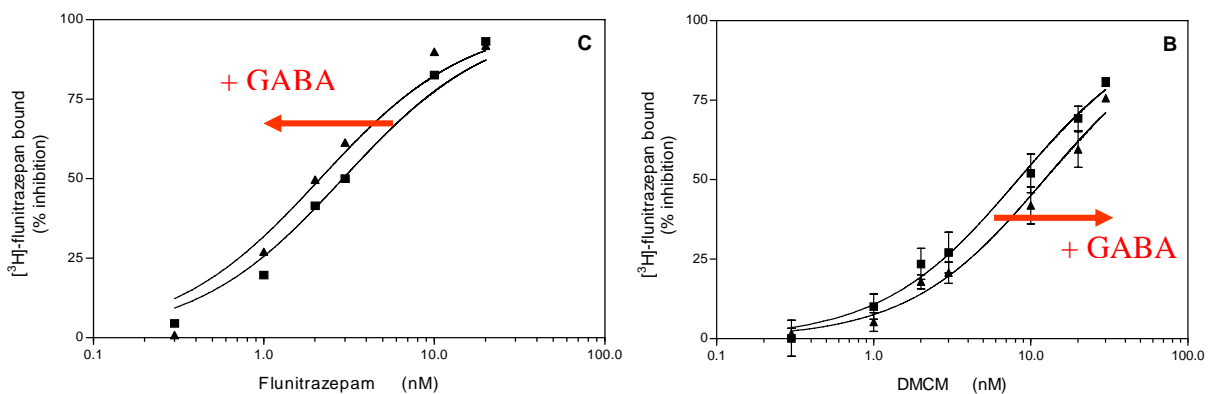
Tecido: Cérebro de rato (sinaptossomas, preparação extensivamente lavada na qual foi retirado tudo o GABA endógeno).

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

Não-específico: Flunitrazepam (50 μM)

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

Referência: *Eur. J. Pharmacol.* 495: 87-96, 2004



Relevância:

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

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

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

Receptor benzodiazepínico periférico

Número de catálogo: R2

Código de preço:

Tecido: rim de rato

Ligante: [³H]-PK11195 (0,2 nM)

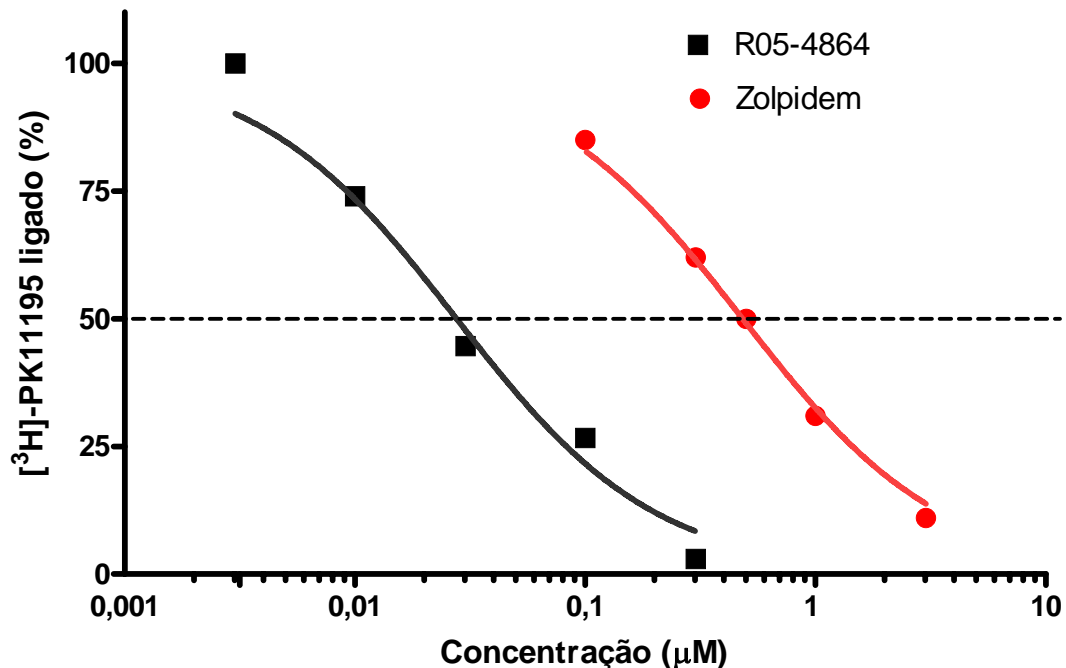
$B_{max} = \pm \text{ pmol/mg proteína}$ $K_d = \pm \text{ nM}$

Cálculo do $K_i = CI_{50} / ?$ (nM)

Não-específico: PK11195 (1 μM)

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

Referência: *Parasitology* 134: 1003-1012, 2007; *Parasitology* 134: 1003-1012, 2007



Relevância:

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

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

Uso clínico:

? agonistas do PBR: papel protetor contra danos que levam a apoptose, como formas reativas de oxigênio e $\text{TNF}\alpha$

? antagonistas do PBR: potencial efeito anti-tumoral, por apoptose

Canal de cálcio voltagem-dependente: sítio das diidropiridinas

Número de catálogo: R3

Código de preço:

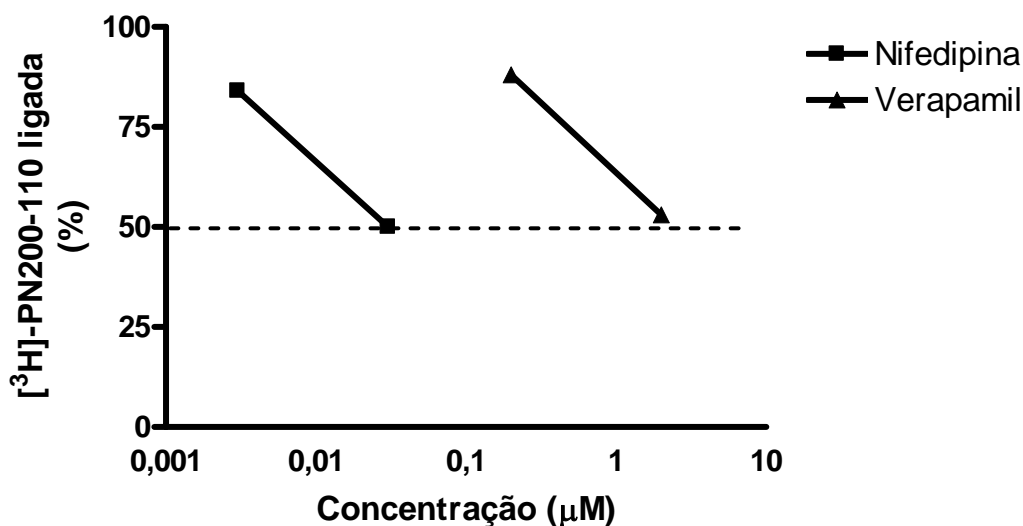
Tecido: microssomas de coração de rato

Ligante: [³H]-PN200-110 (0,1 nM)

Não-específico: Nifedipina (1 μM)

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

Referência: *Circ. Res.* 62: 91-96, 1988; *Circ. Res.* 68: 662-673, 1991



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

Canal de cálcio sensível à rianodina

Número de catálogo: R4

Código de preço:

Tecido: microssomas de coração de rato ; microssomas de gastrocnemius de rato

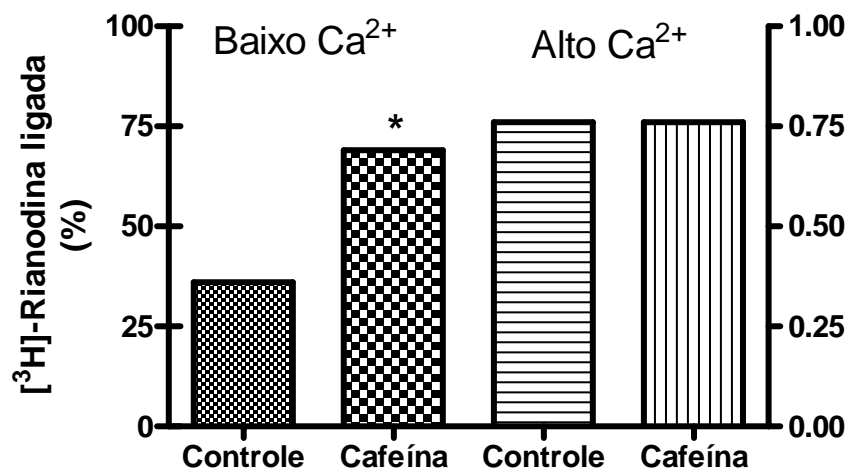
Ligante: [³H]-rianodina (1 nM)

Não-específico: rianodina (10 μM)

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

Controle positivo: rianodina (CI₅₀: 10 nM)

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



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

Receptor glutamatergico ionotrópico: tipo cainato (KA)

Número de catálogo: R5

Código de preço:

Tecido: Cerebelo de galinha (sítios de ligação de baixa afinidade)

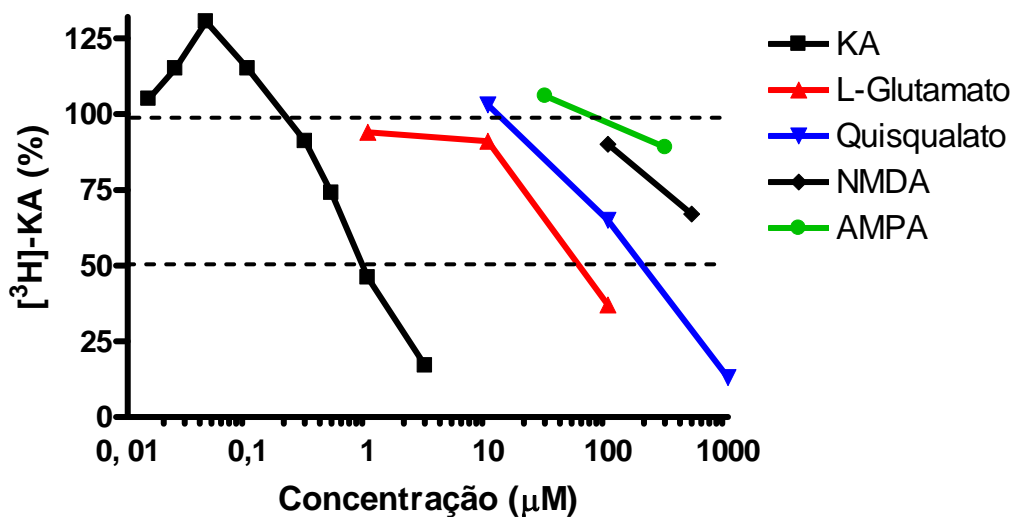
Cérebro de rato (sítios de alta afinidade)

Ligante: [³H]-KA (5 nM)

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

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

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



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

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

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

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

Receptor glutamatérgico ionotrópico: tipo AMPA

Número de catálogo: R6

Código de preço:

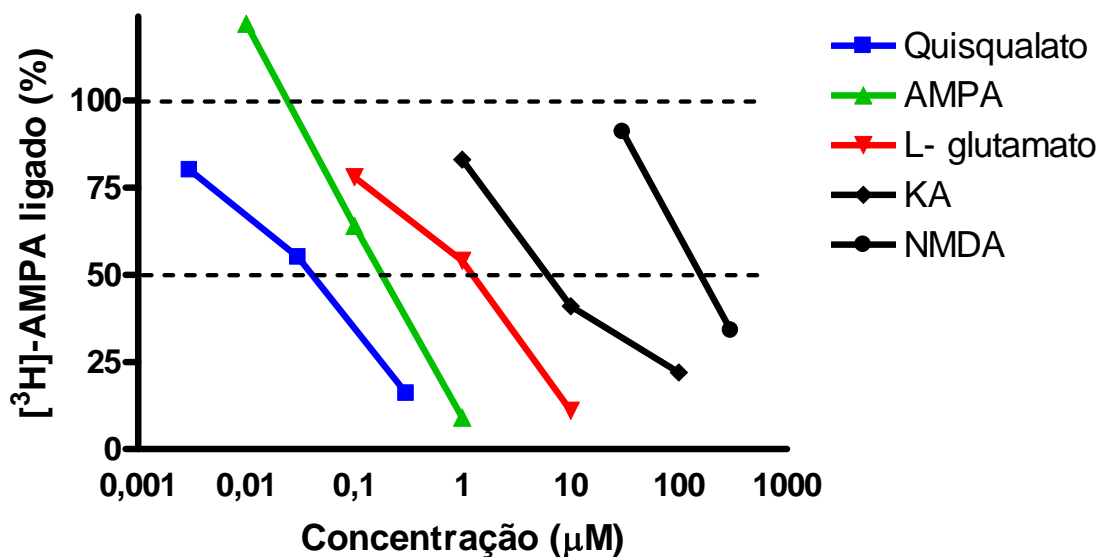
Tecido: Hemisfério cerebral de rato

Ligante: [³H]-AMPA (5 nM)

Não-específico: L-glutamato (1 mM).

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

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



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

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

Moduladores positivos do AMPA teriam efeito nootrópico

Receptor glutamatérgico ionotrópico: tipo NMDA

Número de catálogo: R7

Código de preço:

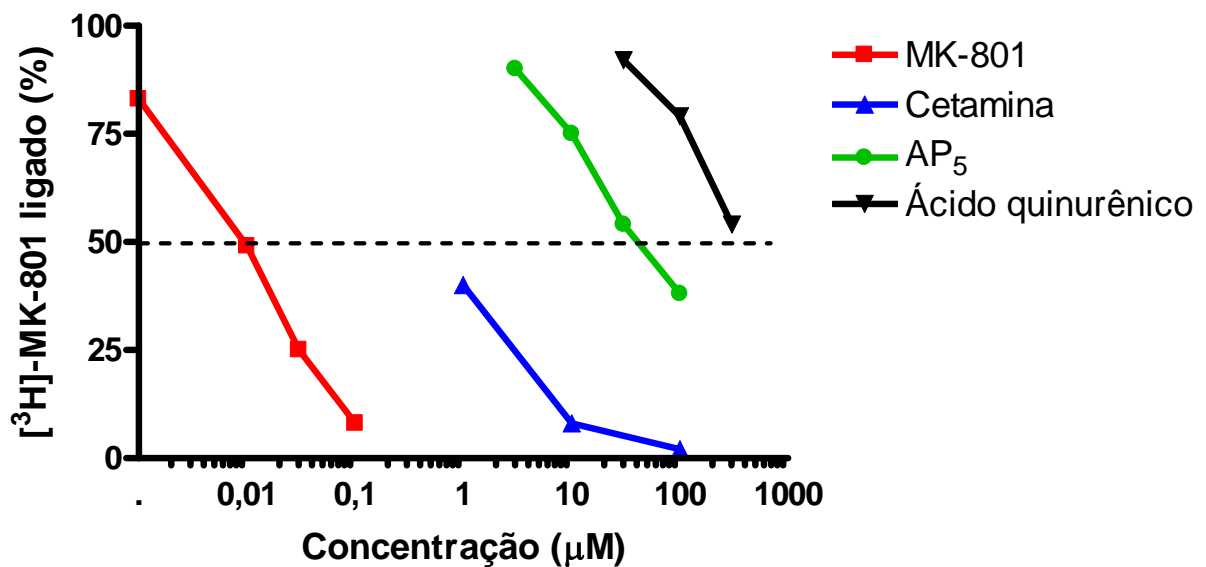
Tecido: Hemisfério cerebral de rato (microsomas)

Ligante: [³H]-MK-801 (2 nM)

Não-específico: Cetamina (3 mM)

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

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



Relevância: O receptor glutamatérgico do tipo NMDA está envolvido em importantes processos fisiológicos (e.g. desenvolvimento e aprendizado), assim como no fenômeno de excitotoxicidade (um dos fatores que levam à morte celular necrótica devida à isquemia, injúria traumática cerebral, hipoglicemia e crise de epilepsia). A ativação de receptores glutamatérgicos pode também participar como fator etiológico de doenças neurodegenerativas crônicas específicas como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington. O receptor NMDA exibe sítios de ligação para a glicina, co-agonista, e para o L-glutamato, neurotransmissor fisiológico que abre um canal permeável aos íons cálcio e sódio; além de sítios moduladores, um dos quais ligam as fenciclidinas e o MK-801 (sítio localizado no interior do canal iônico).

Os bloqueadores do canal são usados como anestésicos dissociativos (ex: cetamina). O ensaio de competição usando [³H]-MK-801 como marcador e preparação bruta de cérebro (contendo glutamato e glicina endógena) permite identificar não somente ligantes do sítio das fenciclidinas, como também antagonistas competitivos do glutamato (ex: AP₅) e da glicina (ex: ácido quinurênico). Nota-se que bloqueadores do sítio da glicina poderiam apresentar menos efeitos adversos do que antagonistas competitivos ou bloqueadores do canal.

Agonistas do sítio da glicina são avaliados para melhorar os sintomas negativos e déficits cognitivos presentes na esquizofrenia (hipótese glutamatérgica).

Receptor α_1 -adrenérgico (tipo α_{1B})

Número de catálogo: R8

Código de preço:

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

Ligante: [^3H]-prazosina (0,1 nM), antagonista

$$B_{\text{max}} = 91,1 \pm 9,9 \text{ pmol/mg proteína}$$

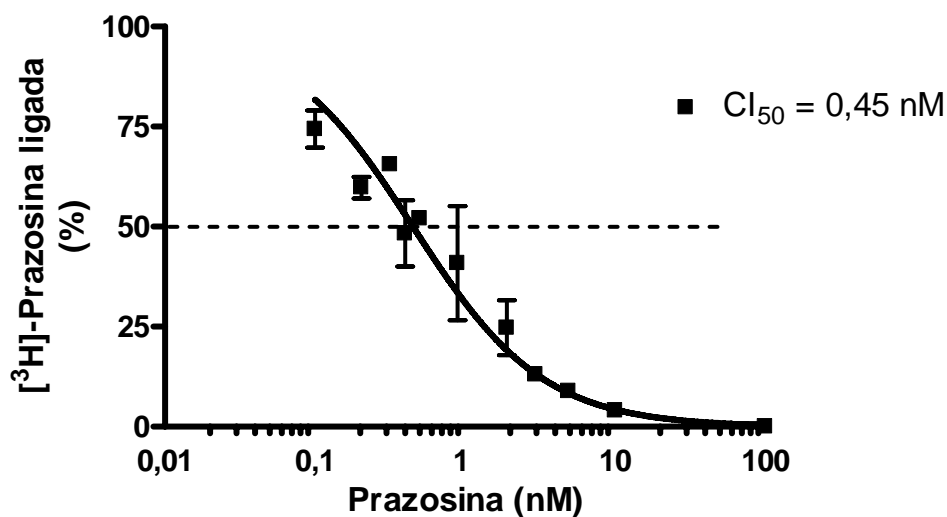
$$K_d = 0,335 \pm 0,024 \text{ nM (n=3)}$$

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

Não-específico: prazosina (1 μM)

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

Referência: *Br. J. Pharmacol.* 111: 533-538, 1994; *Br. J. Pharmacol.* 116: 2591-2596, 1995 (fígado de coelho_alfa1A); *Eur. J. Pharmacol.* 342: 85-92, 1998 (fígado de rato_Alfa1B)



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

Como há 3 subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, utilizamos diferentes preparações para poder avaliar a seletividade da molécula testada, baseado na presença majoritária de um dos subtipos nos tecidos escolhidos: fígado de rato: α_{1B} ; fígado de coelho: α_{1A} (R9)

Receptor α_1 -adrenérgico (tipo α_{1A})

Número de catálogo: R9

Código de preço:

Tecido: microssomas de fígado de coelho (α_{1A})

Ligante: [3 H]-prazosina (0,1 nM), antagonista

$B_{max1} = 34,6 \pm 13,4$ pmol/mg proteína

$Kd1 = 0,464 \pm 0,085$ nM (n=3)

$B_{max2} = 1933 \pm 517$ pmol/mg proteína

$Kd2 = 56,5 \pm 5,38$ nM

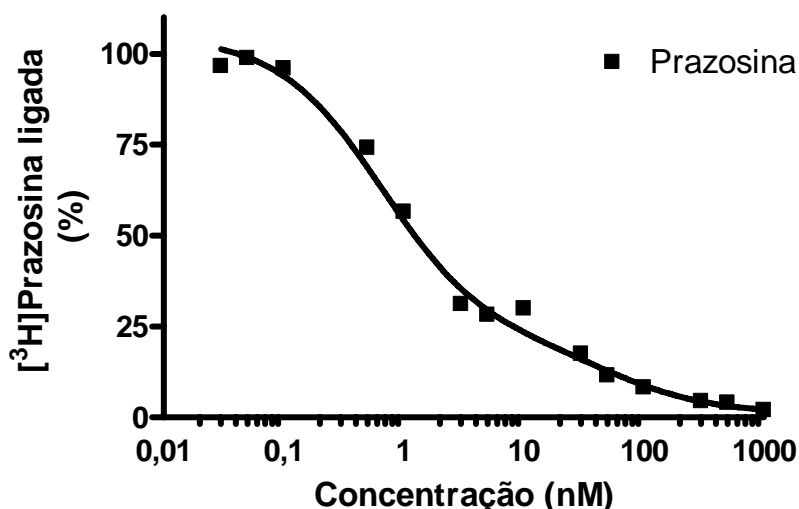
Cálculo do $K_i = CI_{50} / 1,2$ (nM) (valor aproximado já que um composto poderia ter seletividade para um dos sítios e aí um valor de CI_{50} “global” não é correto).

Não-específico: prazosina (1 μ M)

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

Referência: *Br. J. Pharmacol.* 111: 533-538, 1994; *Br. J. Pharmacol.* 116: 2591-2596, 1995

(fígado de coelho_alfa1A); *Eur. J. Pharmacol.* 342: 85-92, 1998 (fígado de rato_Alfa1B)



Relevância: Antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos são úteis em patologias tais como hipertensão grave (vasodilatação via receptor α_{1B}) e no tratamento da hiperplasia prostática benigna (relaxamento do músculo liso do colo da bexiga via receptor α_{1D} e α_{1A} ; relaxamento do m. liso da cápsula da próstata e inibição da hipertrofia, via receptor α_{1A}) eg. tansulosina.

Como há 3 subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, utilizamos diferentes condições experimentais para poder avaliar a seletividade da molécula testada, baseado na marcação preferencial de um dos subtipos: fígado de coelho (α_{1A}) ou fígado de rato (α_{1B} - vide R9).

No caso do fígado de coelho, o sinal é pequeno havendo certa imprecisão e falta de reprodutibilidade. Na maioria dos experimentos (n=4), o melhor ajuste da curva é obtido considerando-se a ligação do radioligante a 2 sítios, sendo um de alta afinidade correspondendo provavelmente ao sub-tipo α_{1A} e um segundo sítio, majoritário, cuja existência e natureza (α_{1L} ?) é discutida. Nas condições utilizadas para o ensaio de competição, 2/3 da ligação da [3 H]-prazosina 0,1 nM ocorreria no sítio de alta afinidade.

Receptor α 2-adrenérgico (tipo α 2A)

Número de catálogo: R10

Código de preço:

Tecido: microssomas cérebro (cortex) de rato (tipo α 2A)

Ligante: [3 H]-RX821002 (0,5 nM), antagonista α 2A e α 2B

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

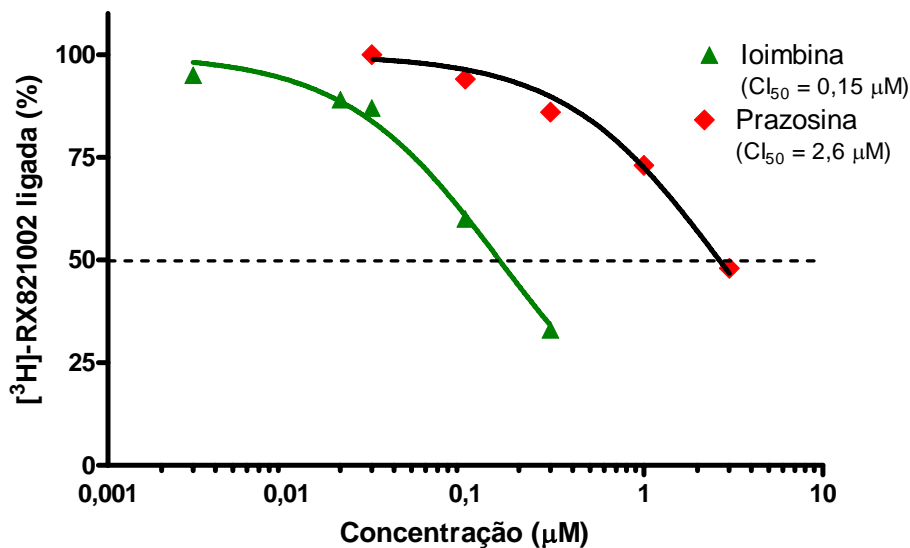
$$K_d = 2,05 \pm 0,28 \text{ nM (n=1)}$$

$$\text{Cálculo do } K_i = CI_{50} / 1,25 \text{ (nM)}$$

Não-específico: (-) adrenalina (100 μ M)

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

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



Relevância:

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

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

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

Receptor serotoninérgico (5-HT_{2A})

Número de catálogo: R11

Código de preço:

Tecido: Cérebro (córtex) de rato (sinaptossomas)

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

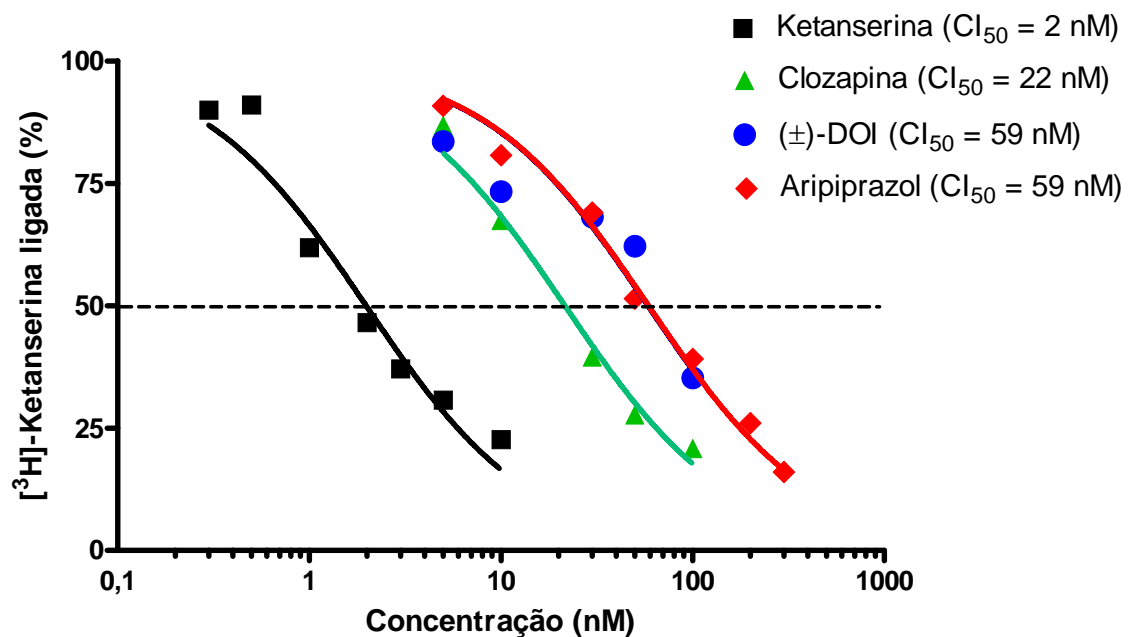
$$B_{max} = 348 \pm 51 \text{ fmol/mg proteína} \quad K_d = 1,77 \pm 0,07 \text{ nM (GILDA-n=1)}$$

$$\text{Cálculo do } K_i = CI_{50} / 1,56 \text{ (nM)}$$

Não-específico: ketanserina (1 μM)

Controle positivo: Ketanserina (CI₅₀: 2 nM)

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



Relevância:

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

Receptor serotoninérgico (5-HT_{2A}): ensaio para determinação da eficácia intrínseca

Número de catálogo: R11F*

Código de preço:

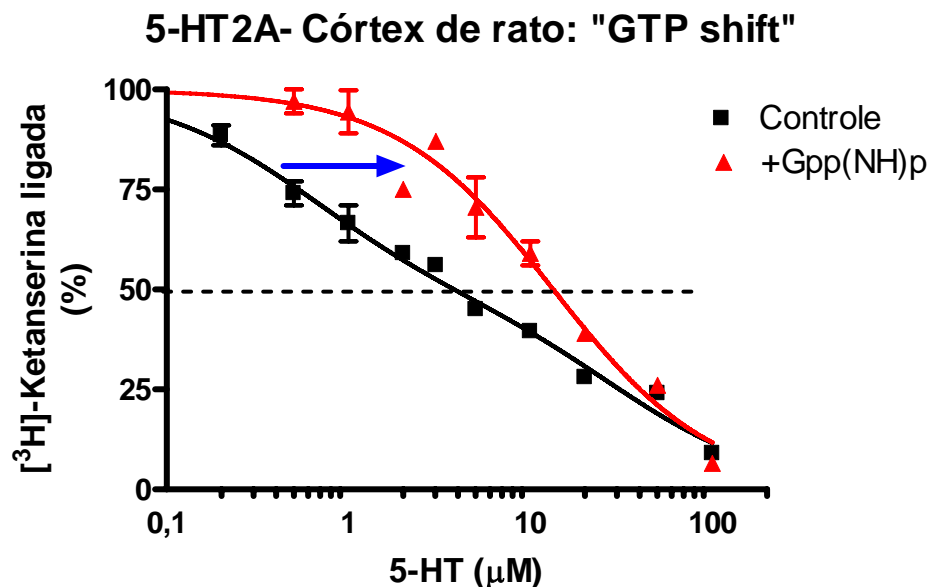
Tecido: Cérebro (córtex) de rato (sinaptossomas)

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

Não-específico: ketanserina (1 μM)

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

Referência: *Mol. Pharmacol.* 38: 604, 1990



- No caso de agonista (como o 5-HT), a curva de competição na ausência de GTP apresenta uma inclinação menor do que o normal (coeficiente de Hill < 1). A adição de Gpp(NH)p (GTP não hidrolisável) ao meio de incubação desestabiliza o complexo ternário (Ligante-Receptor-Proteína G) que apresenta alta afinidade para o agonista, levando assim à formação de complexo binário (Ligante-Receptor), de afinidade menor. Neste caso, a parte superior da curva é deslocada para direita, fazendo com que a curva adquira uma inclinação normal (coeficiente de Hill = 1).

- No caso de antagonista, como a ketanserina, a curva de competição já possui inclinação normal (coeficiente de Hill = 1) na ausência de GTP. Neste caso, a adição de GTP (ou Gpp(NH)p) não altera o perfil da curva.

Receptor serotoninérgico (5-HT_{1A}) - [³H]-8-OH-DPAT

Número de catálogo: R12

Código de preço:

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

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

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

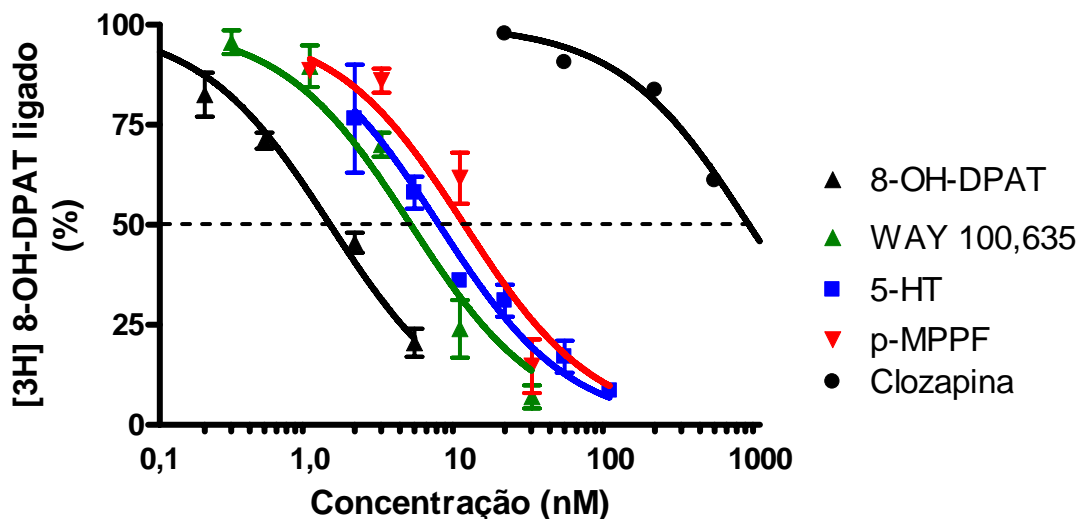
$K_d = 0,7 \pm 0,1 \text{ nM (n=2)}$

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

Não-específico: 5-HT (10 μ M)

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

Referência: *J. Neurochem.* 44: 1685, 1985; *Brain Res.* 590: 229, 1992



Relevância:

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

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

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

Receptor serotoninérgico (5-HT_{1A}) - [³H]-MPPF

Número de catálogo: R13

Código de preço:

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

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

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

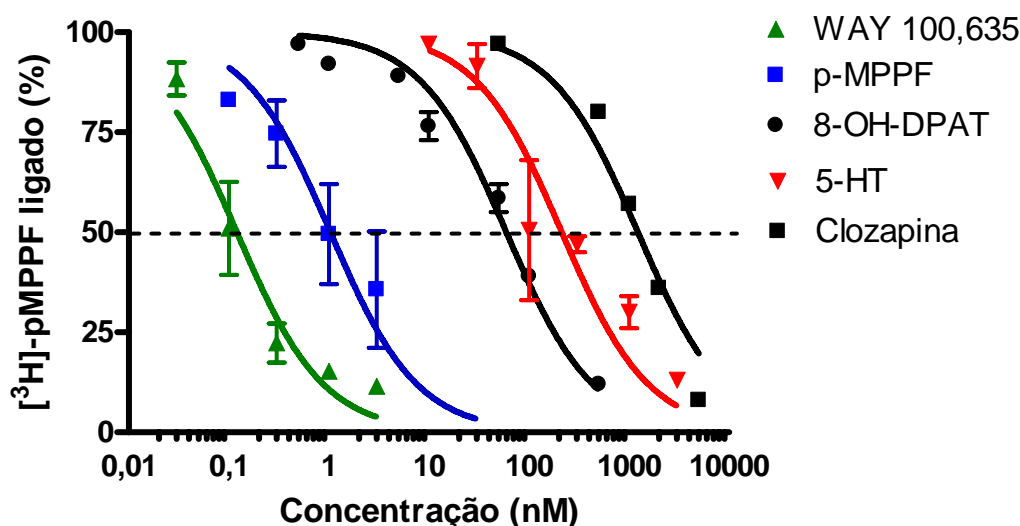
$K_d = 0,855 \pm 0,055 \text{ nM (n=2)}$

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

Não-específico:

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

Referência: *European J. Pharmacol.* 386: 97-103, 1999



Relevância:

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

Receptor 5-HT_{1A}: ensaio para determinação da eficácia intrínseca

Número de catálogo: R14F

Código de preço:

Ensaio: através do cálculo da razão entre valores de K_i para binding aos estados de baixa afinidade (radioligante antagonista, MPPF – R12) e de alta afinidade (radioligante agonista, 8-OH-DPAT – R11)

Controle positivo: 5-HT, (+) 8-OH-DPAT, Clozapina, p-MPPF, WAY 100635

Referências: *Eur. J. Pharmacol.* 386: 97–10, 1999

	Antagonista [³ H]-p-MPPF K_i (1) - nM	Agonista [³ H]-8-OH-DPAT K_i (2) - nM	Razão K_i (1)/ K_i (2)	Razão (Assié <i>et al.</i> , 19979)
5-HT	191	3,0	64	110
(+) 8-OH-DPAT	38	0,56	68	23
Clozapina	778	349	2,2	2,2
p-MPPF	0,63	4,61	0,14	ND
WAY 100635	0,076	1,95	0,039	0,23

Relevância:

O princípio deste ensaio baseia-se no fato de existir evidências de que os agonistas se ligam com maior afinidade à conformação “ativa” do receptor (i.e. induzida/selecionada por um radioligante agonista) do que à conformação “inativa” (i.e. induzida/selecionada por um radioligante antagonista), exibindo assim razão de K_i (1/2) > 1. Por outro lado, os antagonistas tem a mesma afinidade pelas duas conformações do receptor (razão de K_i = 1) e os agonistas inversos apresentam seletividade inversa àquela apresentada pelos agonistas (razão de K_i <1). Nota-se que este raciocínio é um pouco simplista pois sabemos que pode haver eficácias intrínsecas diferente por um mesmo composto, dependendo do efeito medido (Seletividade funcional).

Neste ensaio, utilizamos como controles: 2 agonistas (5-HT e 8-OH-DPAT), 2 antagonistas (clozapina e p-MPPF) e um agonista inverso (WAY 100635).

Esquizofrenia: o fato de ter atividade agonística no rec. 5-HT_{1A} faria parte do mecanismo de ação de alguns antipsicóticos atípicos (ziprasidona)

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

Receptor Serotoninérgico: tipo 5-HT_{2C}

Número de catálogo: R15

Código de preço:

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

Ligante: [³H]-Mesulergina (1nM) (ligante seletivo para receptores 5-HT_{2C})

$B_{max} = 18,7 \pm 1,2 \text{ pmol/mg proteína}$

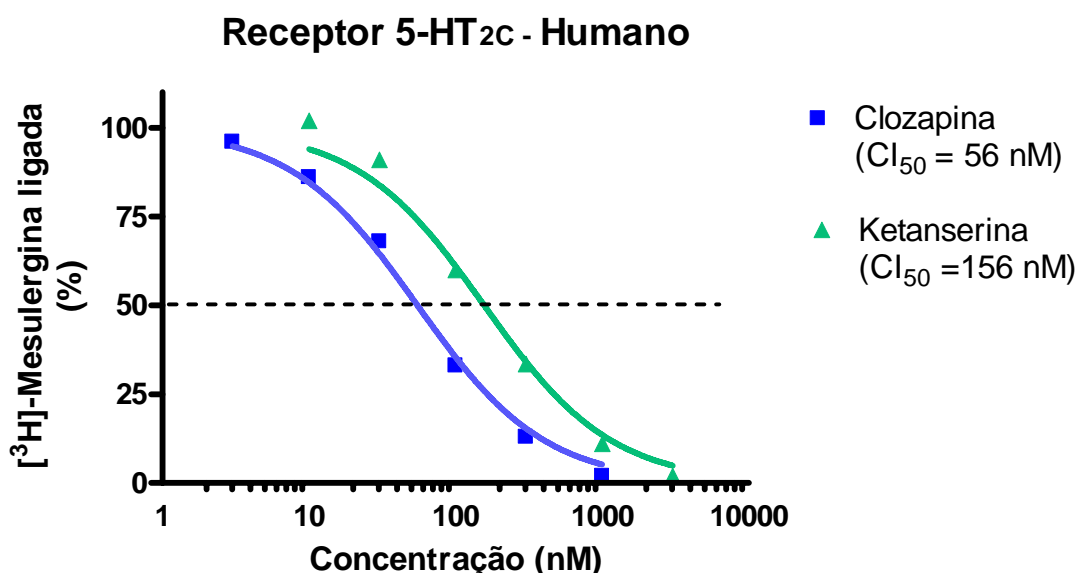
$K_d = 0,70 \pm 0,16 \text{ nM}$

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

Não-específico: Serotonina (100 μ M)

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

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



Relevância:

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

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

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

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

Receptor dopaminérgico: tipo D2-like

Número de catálogo: R16

Código de preço:

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

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

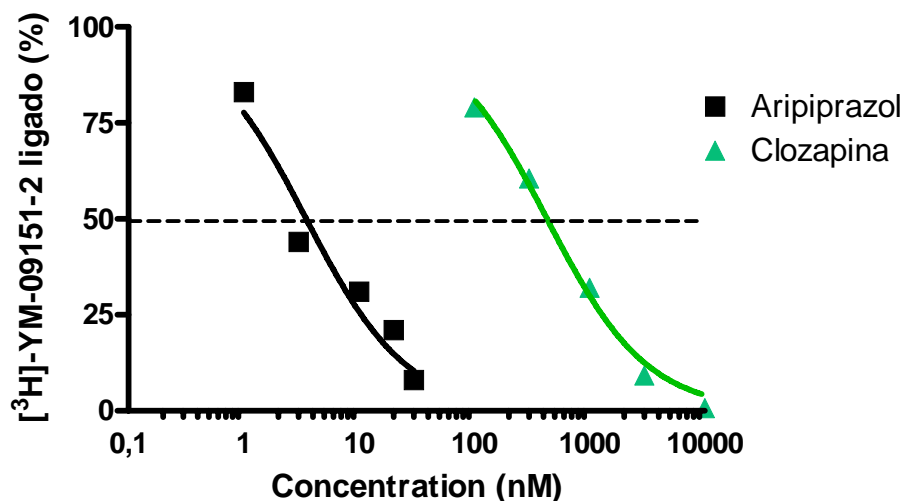
$$B_{max} = \pm \text{ pmol/mg proteína} \quad K_d = 0,036 \pm \text{ nM}$$

$$\text{Cálculo do } K_i = CI_{50} / 3,78 \text{ (nM)}$$

Não-específico: Sulpirida (30 µM)

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

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



Relevância:

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

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

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

Receptor Dopaminérgico: tipo D4

Número de catálogo: R17

Código de preço:

Tecido: Membranas de células transfectadas com receptor D4 humano

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

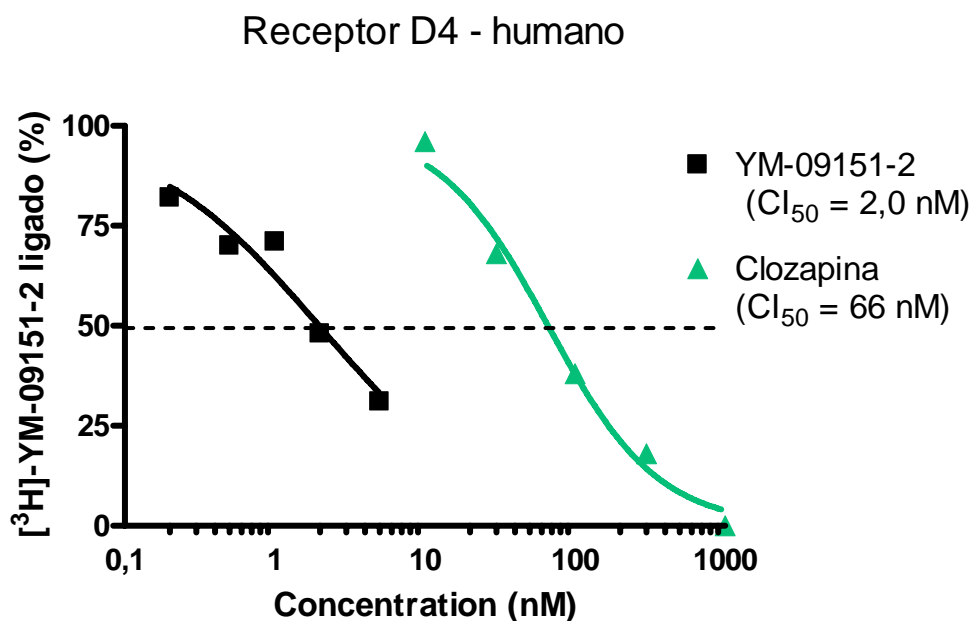
$B_{max} = 5,79 \pm 0,35 \text{ pmol/mg proteína}$ $K_d = 2,73 \pm 0,33 \text{ nM (n=1)}$

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

Não-específico: Clozapina (10 μ M)

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

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



Relevância:

Esquizofrenia: antagonistas D4 : este bloqueio poderia ser (em parte) responsável pelo efeito antipsicótico da clozapina (atípico) pelo qual tem maior afinidade do que para o receptor D2.

Receptor muscarínico (não seletivo/M1)

Número de catálogo: R18

Código de preço:

Tecido: Córtex de rato (sinaptossomas):

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

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

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

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

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

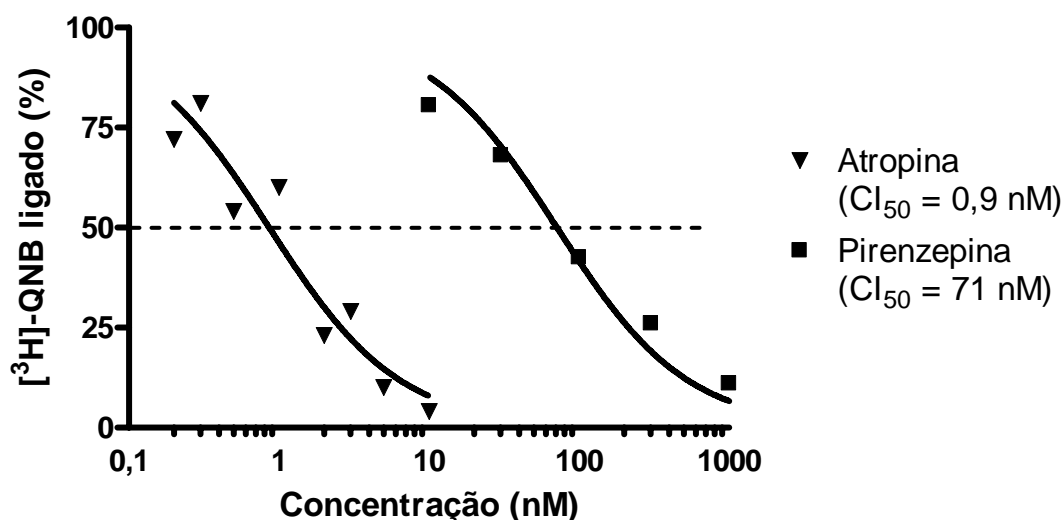
Cálculo do $K_i = CI_{50} /$ (nM)

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

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

Referência: M.H. Richards *Br. J. Pharmacol.* 99:753-761, 1990

A.F. Castoldi et al. *Life Sciences* 78:1915– 1924, 2006



Relevância:

Doenças e potenciais alvos para fármacos (IUPHAR database):

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

Na⁺/K⁺-ATPase

Número de catálogo: E1

Código de preço:

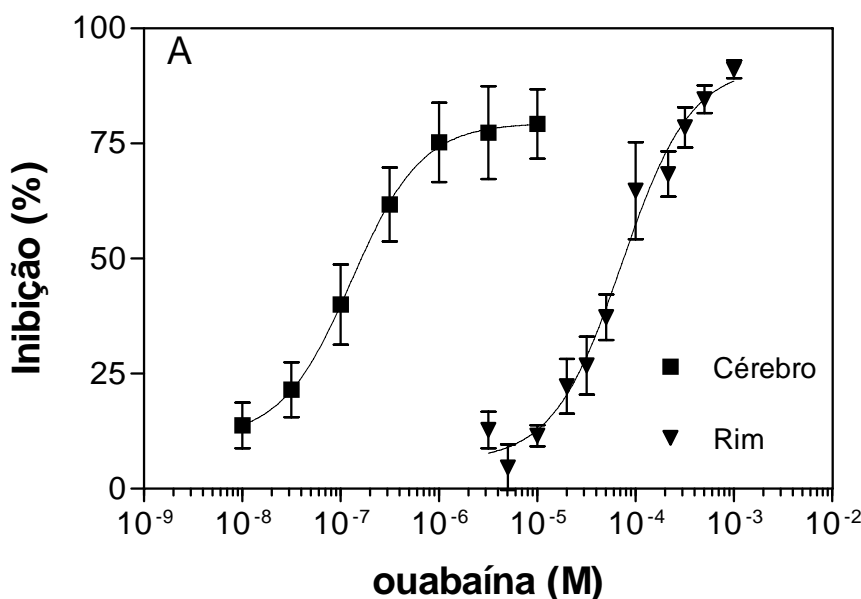
Tecido: Rins e Hemisférios cerebrais de rato (microsomas purificados)

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

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

Controle Positivo: Ouabaína

Referência: *Biochem. Pharmacol.* 33: 47-53, 1984



Relevância: A Na⁺/K⁺-ATPase é a enzima responsável pelo transporte transmembranar ativo dos íons Na⁺ e K⁺ na célula. A Na⁺/K⁺-ATPase é o receptor farmacológico dos glicosídeos cardiotônicos, os quais são usados, em associação, no tratamento da insuficiência cardíaca devido ao seu efeito inotrópico positivo. A eficácia terapêutica desses glicosídeos no tratamento da insuficiência cardíaca e de certas arritmias supraventriculares é bem estabelecida sendo que a eficácia deste tratamento foi confirmada definitivamente em dois estudos multicêntricos (*N. Engl. J. Med.* 329: 1-7, 1993; *J.A.C.C.* 22: 955-962, 1993). Contudo estes fármacos possuem um baixo índice terapêutico, o que tem limitado sua utilização. O músculo cardíaco possui três isoformas da subunidade α da Na⁺/K⁺-ATPase, sendo que a isoforma $\alpha 1$ é ubíqua e a isoforma $\alpha 3$, neuronal, estaria localizada no tecido de condução. Não se sabe ainda qual isoforma ($\alpha 1$ e/ou $\alpha 2$) seria o principal alvo do efeito inotrópico dos “digitálicos”. Desta forma, a descoberta de moléculas que permitam uma maior diferenciação entre estas isoformas poderia levar a fármacos com maior índice terapêutico (*Progr. Drug Res.* 47: 9-52, 1996). Tal molécula seria também altamente desejada ao nível da pesquisa básica para poder inibir seletivamente uma das isoformas e assim estudar sua contribuição na homeostasia celular.

Para tanto, utilizamos preparações de rim ($\alpha 1$) e cérebro ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) de rato nos nossos ensaios de screening.

H⁺/K⁺-ATPase

Número de catálogo: E2

Código de preço:

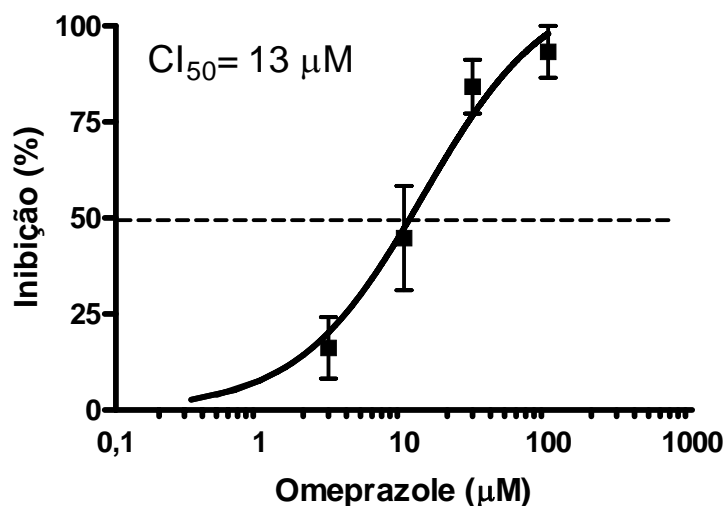
Tecido: microsomas de estômago de rato

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

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

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

Referências: *Eur. J. Pharmacol.* 411: 181-186, 2001; *BMC Gastroenterology* 4: 4, 2004



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

Ca²⁺-ATPase (SERCA)

Número de catálogo: E3

Código de preço:

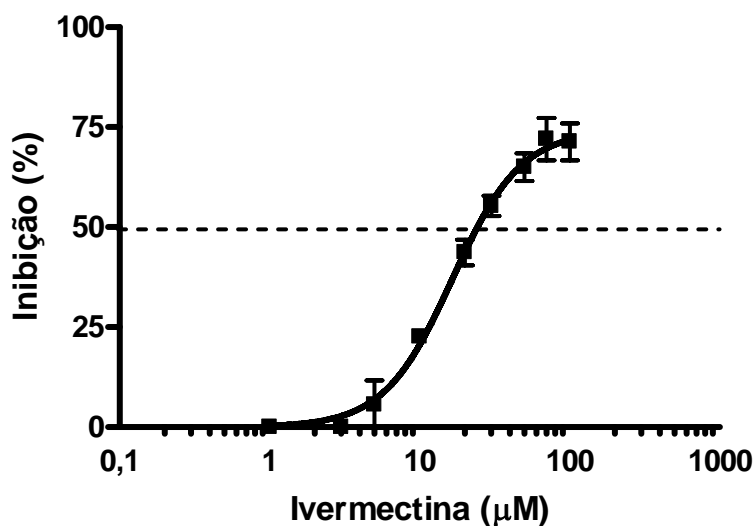
Tecido: microsomas de músculo EDL de rato (SERCA 1A)

Atividade Total:

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

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

Referências:



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

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

Atividade contraturante ou relaxante no músculo liso vascular

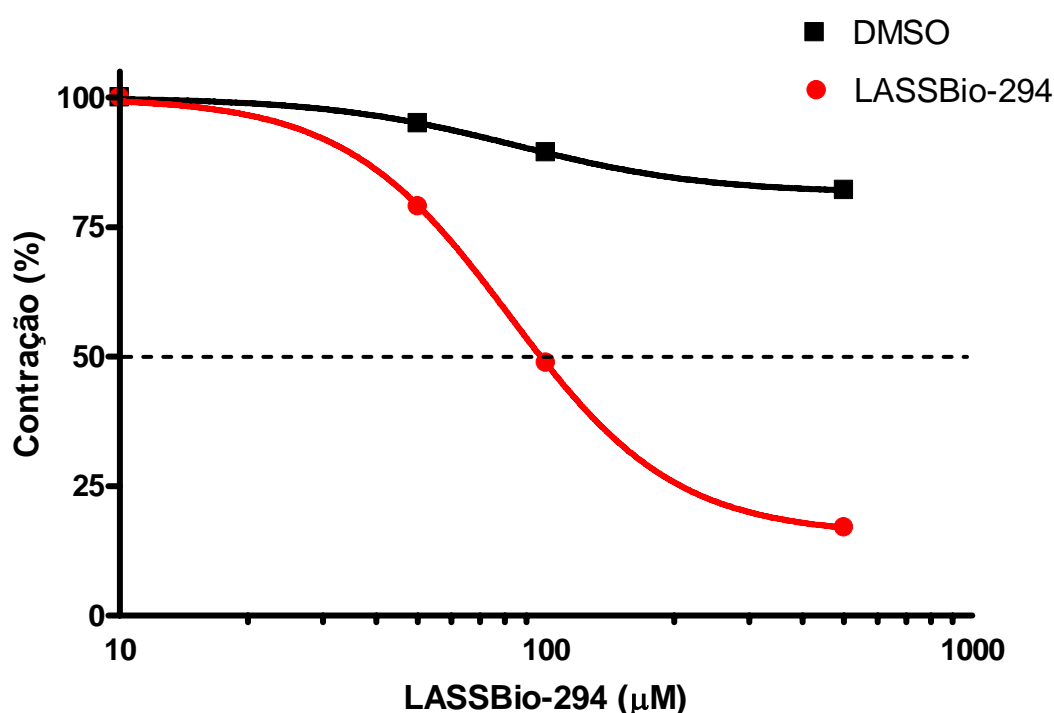
Número de catálogo: F1

Código de preço:

Tecido: aorta de rato (anéis)

Controle Positivo: agente contratante: noradrenalina (1 μ M); agente relaxante endotélio-dependente: acetilcolina (1 μ M)

Referência: *Br. J. Pharmacol.* 135: 293-298, 2002



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

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

Atividade contraturante no *Schistosoma mansoni*

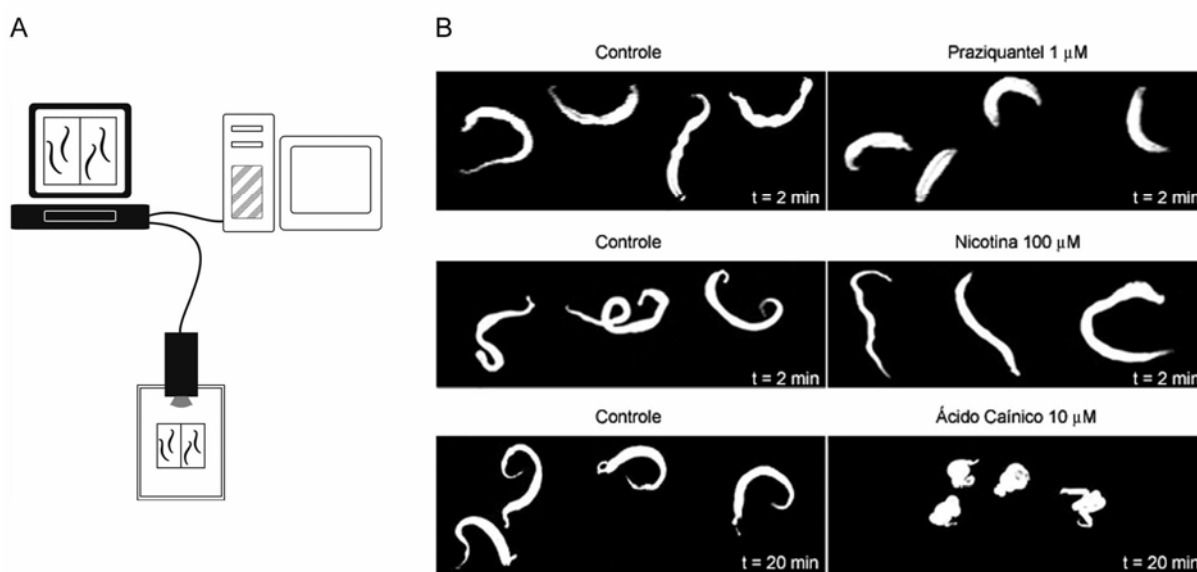
Número de catálogo: F2

Código de preço:

Modelo: Vermes adultos machos, *in vitro*

Controle Positivo: praziquantel (1 μ M); ácido cáinico (10 μ M); (-)Nicotina (100 μ M)

Referência: *Parasitol. Res.* 81: 544-548, 1995; *Biochem. Pharmacol.* 64: 1337-1344, 2002; *Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto*, p207-244 (2009) em: *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar (Eds. Carvalho, OS, Zech Coelho, PM e Lenzi, H)



A: Equipamento utilizado: recipiente de vidro dividido em duas células, contendo 3-4 vermes cada, em banho-maria. Câmera digital ligada a um videocassete e a uma televisão. O sinal é também direcionado para um computador, onde as imagens são analisadas.

B: Fotos típicas, mostrando os vermes na condição-controle e após adição de três substâncias. Nota-se que as moléculas empregadas produziram padrões bem distintos de mudança de atividade motora e aspecto dos vermes. O praziquantel produz um encurtamento rápido, intenso e mantido do verme que adota a forma de meia-lua e perde toda a sua motilidade (paralisia espástica). A nicotina produz um alongamento do verme e uma paralisia flácida. O ácido cáinico produz o encolhimento dos vermes, que se apresentam em forma de saca-rolhas e perdem sua motilidade.

Relevância: A existência de fármacos eficazes e relativamente seguras (praziquantel e oxamniquine) não deve diminuir a busca de novos esquistossomicidas, já que foram descobertas cepas de vermes resistentes a oxamniquine e que há controvérsia quanto ao desenvolvimento de cepas resistentes ao praziquantel. Este ensaio, baseado na análise computadorizada de imagem do verme filmado enquanto está livremente em solução fisiológica, visa determinar se uma molécula é capaz de contrair o *S. mansoni* ou alterar seu padrão de comportamento, e portanto possuir potencial atividade esquistossomicida. Apesar de não existir correlação direta entre efeito esquistossomicida e contraturante, é interessante notar que o praziquantel, fármaco padrão da OMS, produziu intenso e rápido efeito contraturante em concentração “terapêutica”, neste modelo.

Atividade esquistossomicida *in vitro*

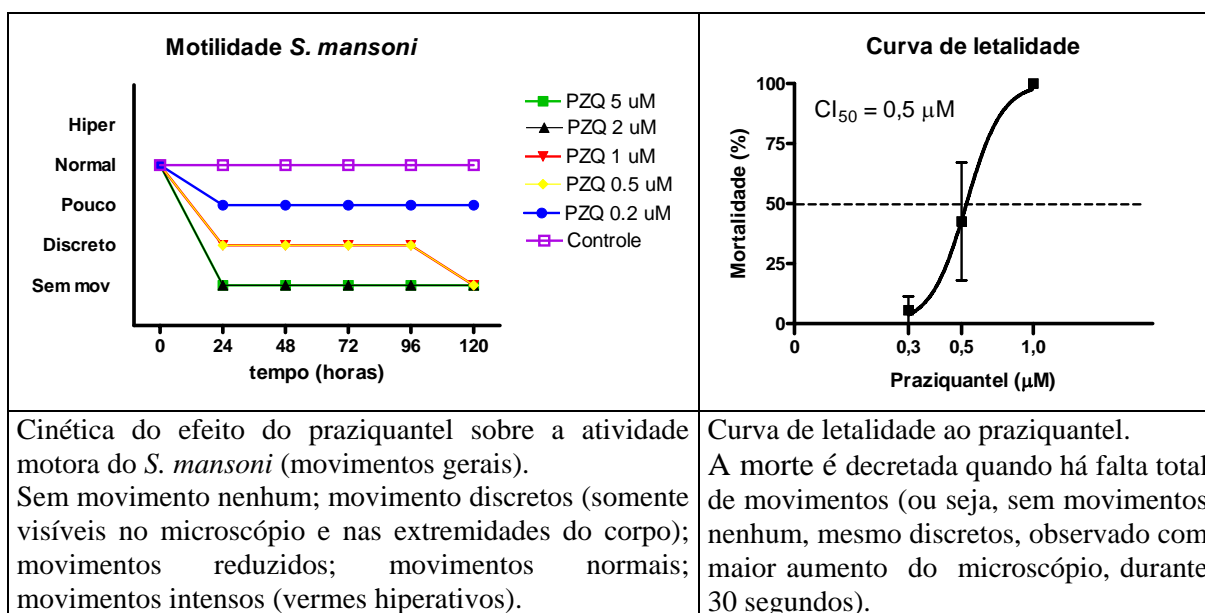
Número de catálogo: F3

Código de preço:

Modelo: Vermes adultos machos e fêmeas, em cultura (DMEM modificado, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e 0,5 mg/ml de anfotericina) mantidos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os vermes são expostos às substâncias em estudo durante cinco dias, havendo observação diária de diferentes parâmetros para avaliação do seu estado geral: atividade motora, alterações no tegumento, fixação pela ventosa, pareamento e taxa de mortalidade, com os seguintes critérios para a atividade motora (movimentos gerais): - sem movimento nenhum; + (discretos) somente visíveis no microscópio e nas extremidades do corpo; ++ (reduzidos); +++ (normais); ++++ (vermes hiperativos).

Controle Positivo: praziquantel (1 µM)

Referência: método adaptado do trabalho de Ramirez e cols. (*Expert Opin. Drug Discov.* 2: S53-S61, 2007). *Parasitol. Res.* 85: 421-423, 1999; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 92: 427-429, 1996; *Nature Review Drug Discovery* 5: 941-955, 2004.



Relevância: Este teste de inibição de motilidade *in vitro*, é mundialmente recomendado para descobrir novos candidatos à fármacos esquistossomicidas (*Nature Review Drug Discovery* 5: 941-955, 2004). A metodologia usada é semelhante às condições de ensaio adotadas por dois centros certificados pela OMS (vide *Expert Opin. Drug Discov.* 2: S53-S61, 2007)

4. MANUSEIO DAS SUBSTÂNCIAS

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

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

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

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

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

Estratégia proposta (padrão para screening):

- Realizar os ensaios em duplicata (2 tubos / condição experimental, como na firma especializada CEREP) para limitar os custos. Nota-se que as condições controles de ligação total e ligação não-específica (não cobrados), são sempre feitos em triplicata)

- Iniciar com uma avaliação preliminar de cada composto, com apenas duas concentrações (1 e 30 μM), sempre em duplicata:
 - . Caso não houver pelo menos 50% de inibição da ligação do radioligante na concentração de 30 μM , limita-se assim o custo a 4 tubos por composto.
 - . Caso houver inibição muito alta na concentração de 30 μM , já temos um dado em concentração 30 vezes menor, para melhor direcionar a segunda etapa visando a obtenção do valor de CI_{50}
- Fazer uma segunda avaliação, com pelo menos 3 concentrações diferentes daquelas de *screening*, visando a obtenção de curva de competição mínima para estimativa do valor de CI_{50} (5 concentrações em torno do CI_{50}).

Entrega dos compostos

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

Informações necessárias (*: indispensáveis):

- peso molecular*
- solubilidade*: DMSO 100% é o nosso padrão, caso não houver informação do solicitante (H_2O e ETOH são também possíveis)
- estabilidade
- sensibilidade à luz

5. ENTREGA DOS RESULTADOS

Prazo padrão: 4 semanas após recebimento dos compostos

Meio: via Internet

Formato:

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

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

onde:

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

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

[L] = concentração do radioligante no ensaio

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

6. PREÇOS OU CONDIÇÕES DE COLABORAÇÃO

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

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

7. INSTALAÇÕES

Os ensaios de radioligação (*binding*) são realizados em local e com rotina devidamente registrados junto à CNEN (Ofício n^o. 1536/2006-CGMI/CNEN), na sala J1-22 do bloco J do CCS-UFRJ, recentemente reformada (vide fotos abaixo), sob a responsabilidade de profissional (Prof. François G. Noel) registrado na CNEN para o uso de radioisótopos na área de Aplicação em Pesquisa (licença AP-0371).

A infraestrutura conta com 2 banhos maria, 6 unidades de filtração, 2 bombas de vácuo, um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 2100TR), além da infraestrutura necessária para o armazenamento e eliminação dos produtos radioativos (capela, pia profunda, geladeira, freezer, lixeiras e caixas de acrílico, todos devidamente identificados) assim como dos métodos de radioproteção (contador Geiger, luvas, óculos...).

