

Farmacología y Farmacoterapia I

Grado en Farmacia - UAH

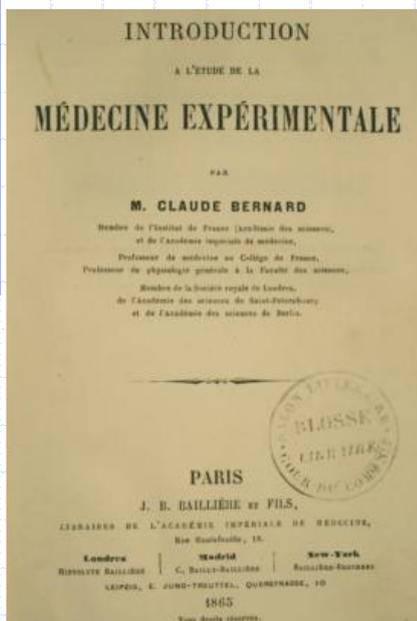
Seminario 1 (curso 2021-2022)

Técnicas de detección de actividad farmacológica.
Cribado farmacológico.
Medida de la afinidad utilizando radioligandos.

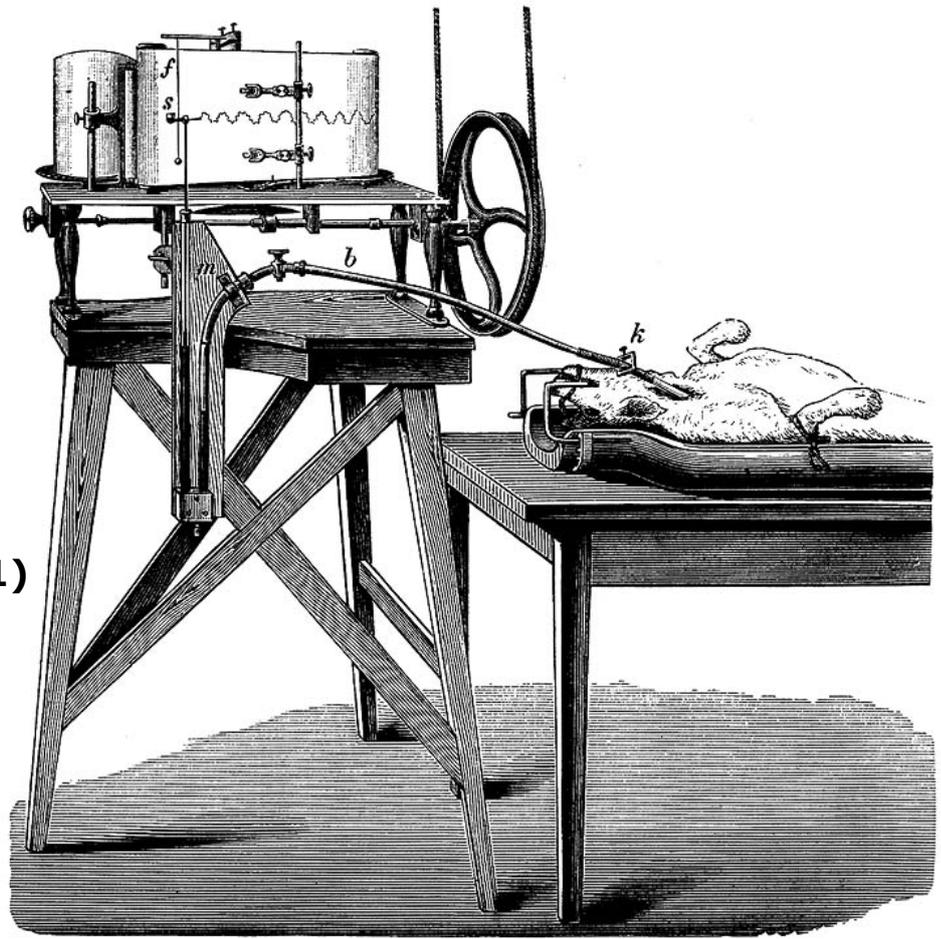
Prof. Federico Gago Badenas
Universidad de Alcalá
(federico.gago@uah.es)



Claude Bernard: Introducción al estudio de la Medicina Experimental



The Lesson of Claude Bernard (1813–1878)
por Léon Augustin L'hermitte



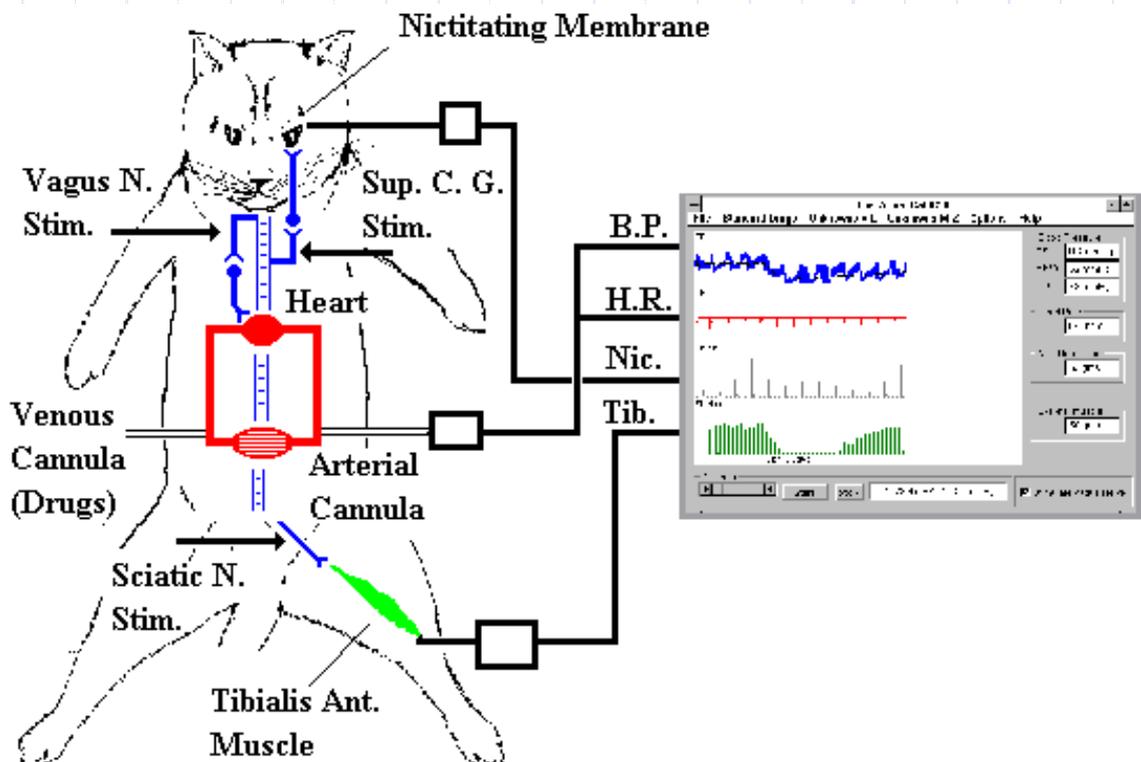
Langendorff, Oskar (1891)

Physiologische Graphik:
*Ein Leitfaden der in der
 Physiologie gebräuchlichen
 Registrirmethoden.*

Leipzig, Wien: Deuticke

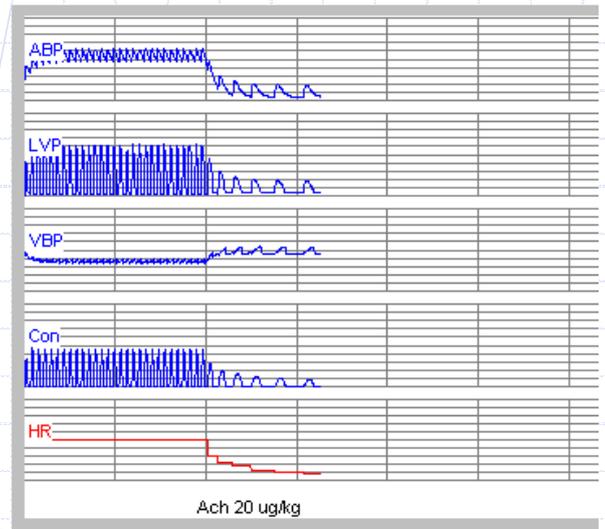
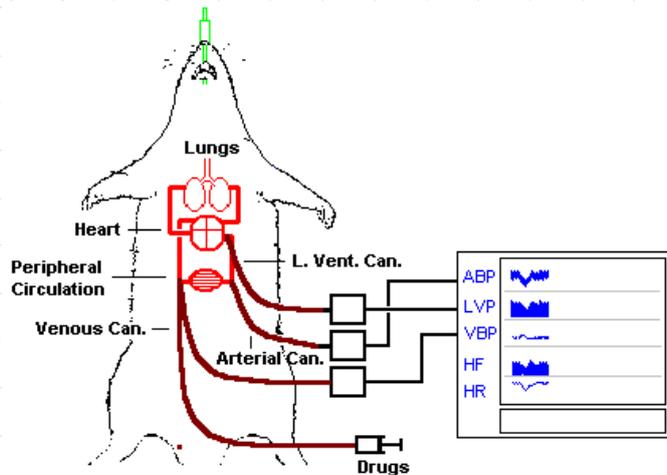
The Anaesthetised Cat Preparation

Preparación de Gato Anestesiado ("PRÁCTICAS")



The Pithed Rat Preparation ("The Virtual Rat")

Preparación de Rata Desmedulada ("PRÁCTICAS")



ABP = Arterial blood pressure
Presión sanguínea arterial

LVP = Left ventricular pressure
Presión ventricular izquierda

VBP = Venous blood pressure
Presión sanguínea venosa

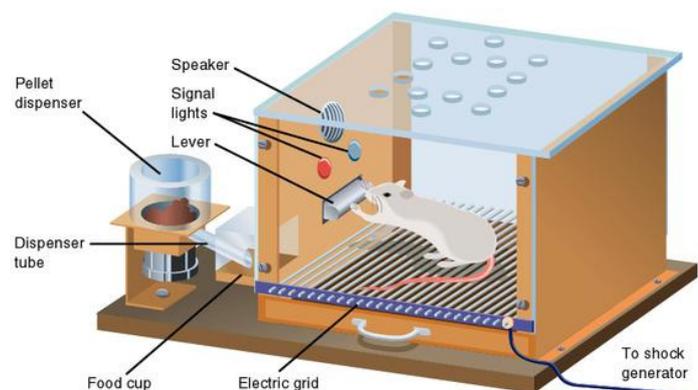
Con/HF = Force of contraction of heart
Fuerza de contracción cardíaca

HR = Heart rate
Ritmo cardíaco

Estudios tradicionales de comportamiento en animales de experimentación (ejemplos)



Condicionamiento operativo



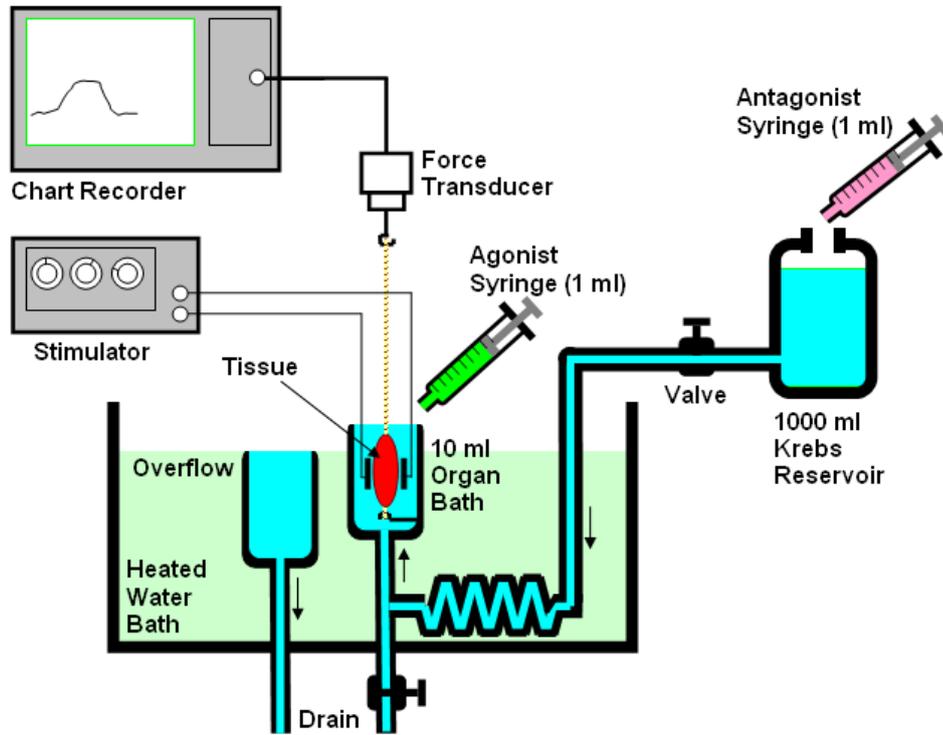
La caja de Skinner

Test de Irwin



Organ Bath Preparations

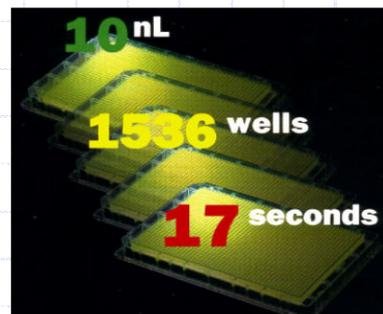
Preparaciones de Baño de Órganos (“PRÁCTICAS”)



Cribado de altas prestaciones High-Throughput Screening (HTS)



automatización



miniaturización

velocidad

Del formato de 96 pocillos a las microplacas de 384 y 1536 pocillos

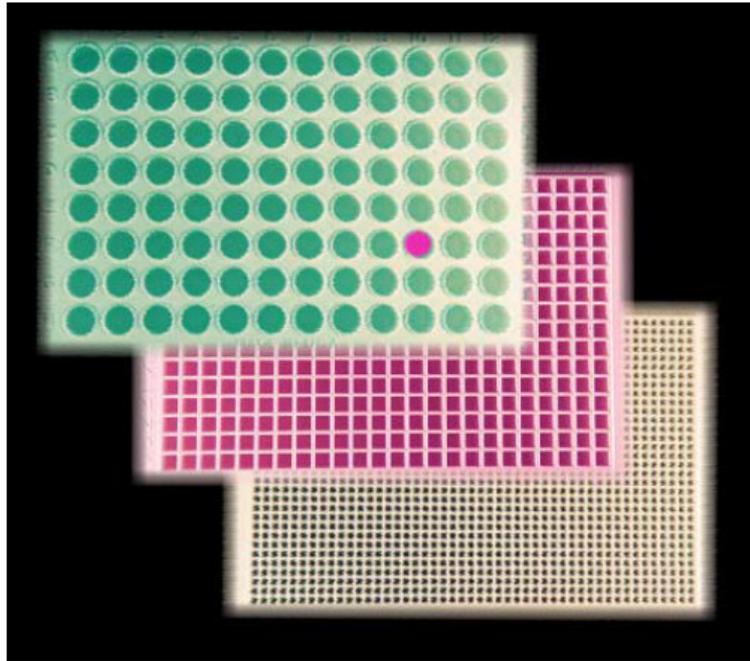
Volúmenes y potencial de prestaciones

Densidad y volumen de los pocillos

96
(0.05 to 0.3 ml)

384
(0.025 to 0.1 ml)

1536
(0.001 to 0.01 ml)



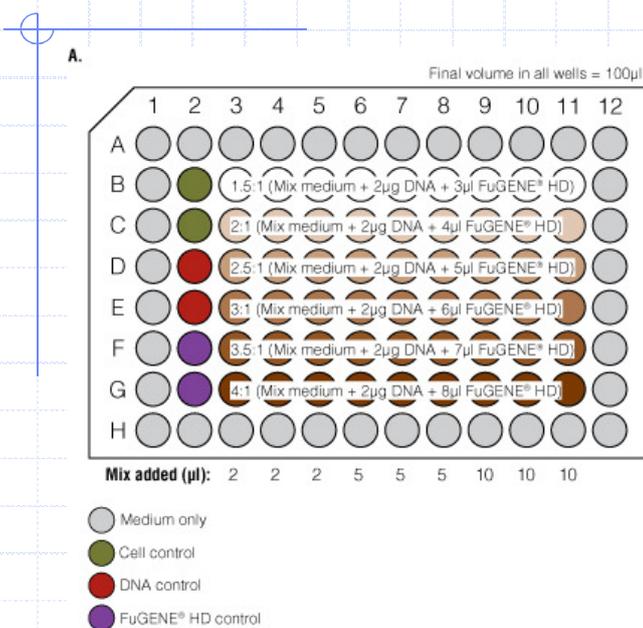
Potencial de rendimiento

10^4
per day

10^5
per day

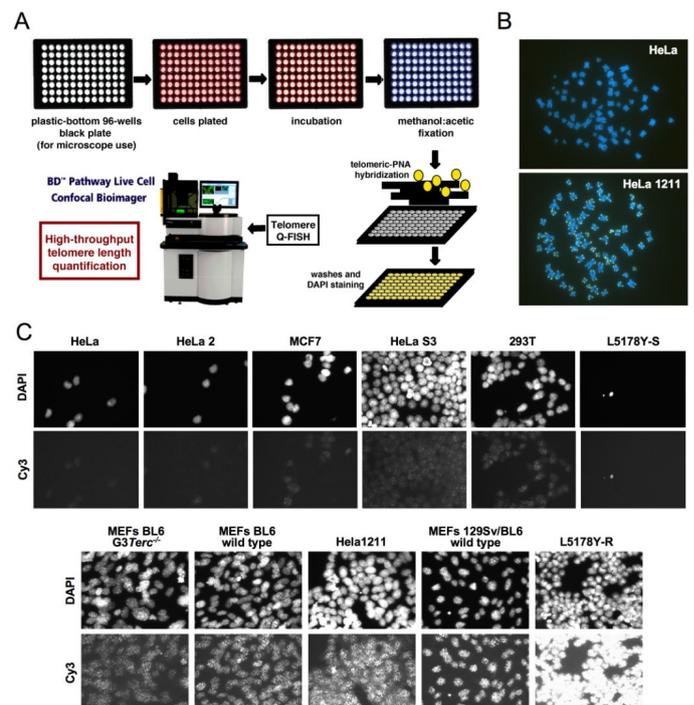
10^6
per day

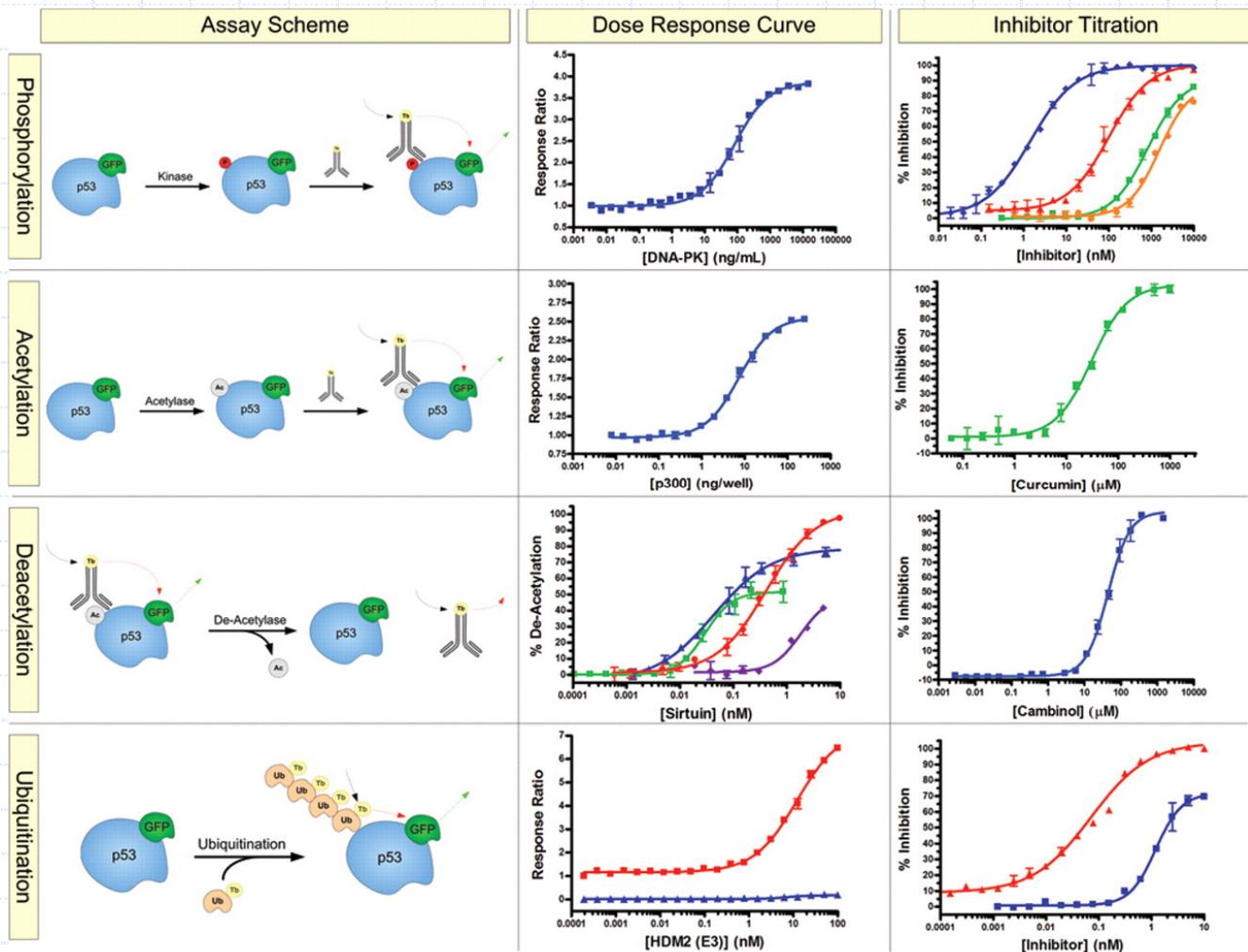
Ensayos en placas de micropocillos



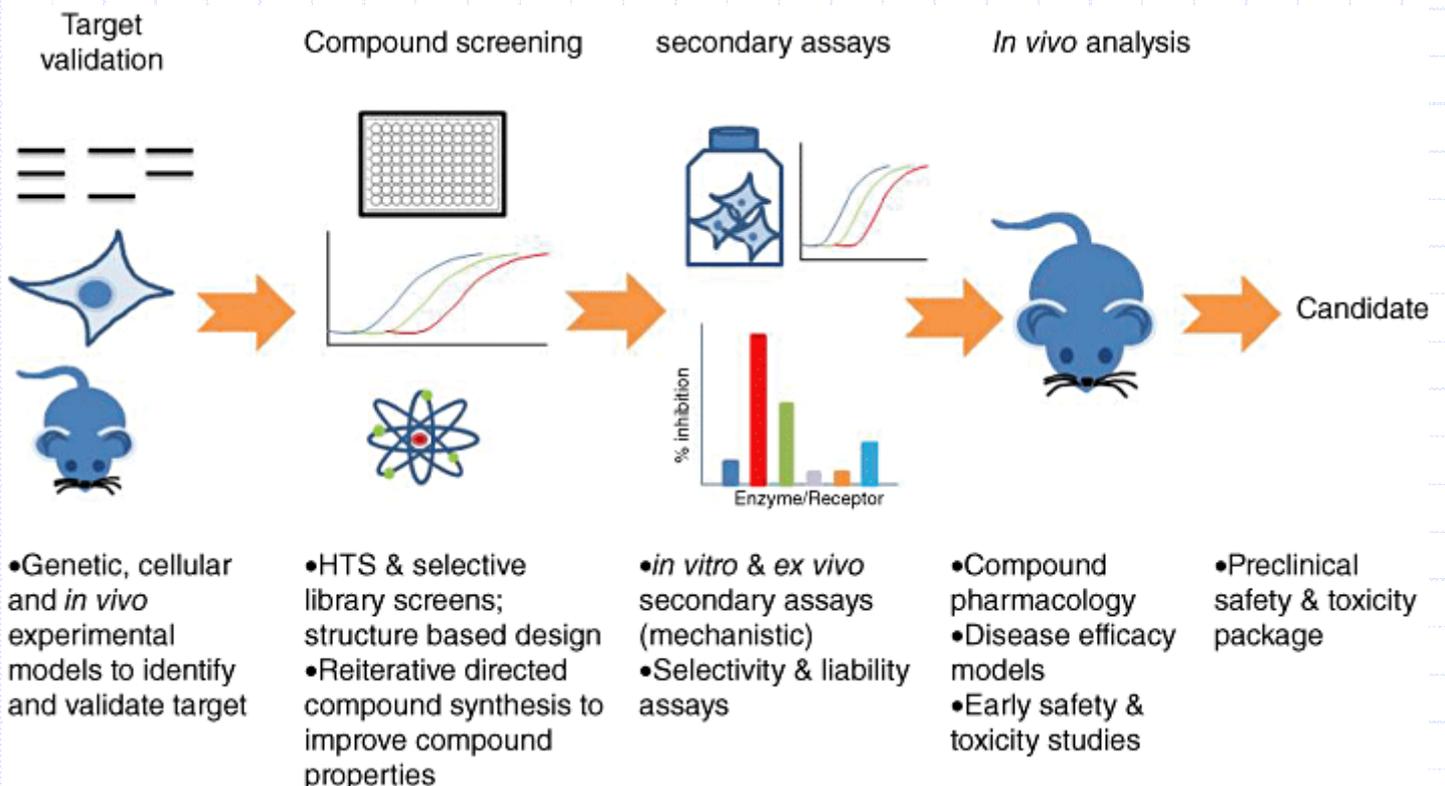
B.

Day 1: Seed plate. → **Day 2: Transfect.** → **Day 3 or 4: Assay.**
 Harvest, count and plate cells. Mix medium + DNA + FuGENE[®] HD for up to 15 minutes. Add to cells. Measure cell viability and reporter activity.





Tipos de ensayo de cribado farmacológico empleados en el descubrimiento de fármacos



16,320 compounds
from a chemical library

whole-cell
immunodetection assay

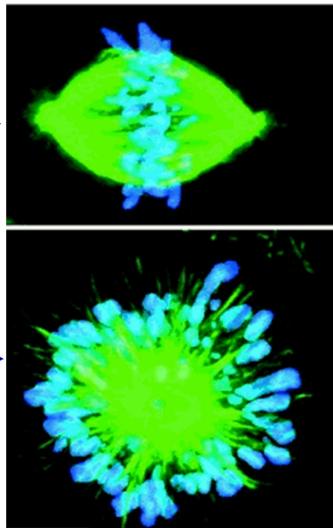
139 cell-permeable compounds
that caused
increases in phosphonucleolin
staining in A549 cells

in vitro tubulin
polymerization assay

86 no effect 52 destabilization 1 stabilization

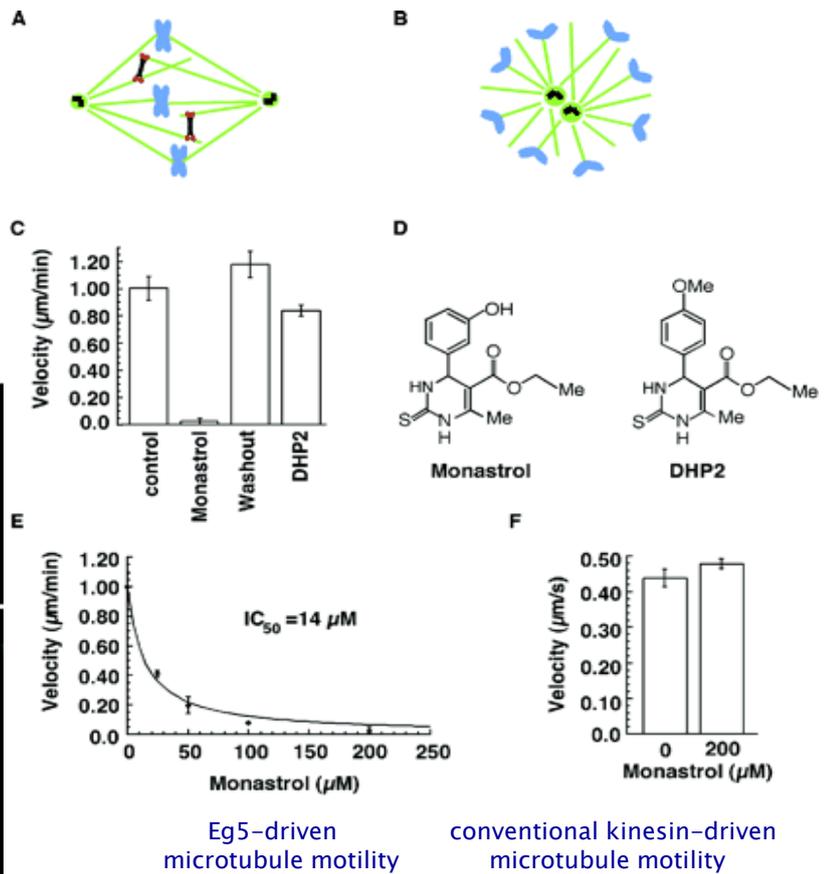
fluorescence microscopy

27 no visible effects
12 pleiotropic effects
42 affect interphase
and mitosis
5 affect only mitosis



α -tubulin
chromatin

Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen



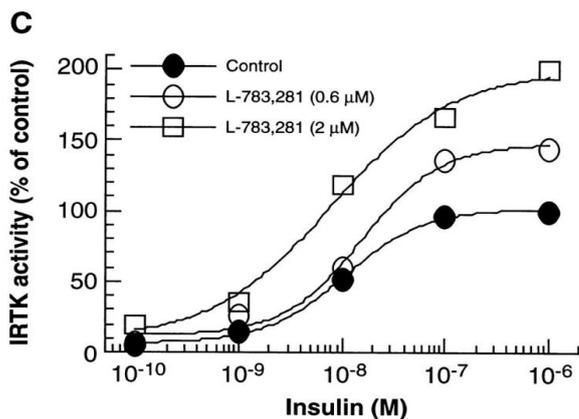
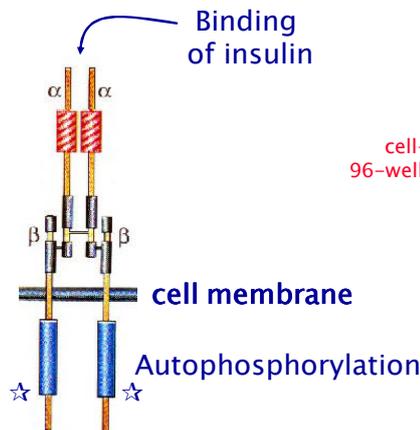
Mayer et al. *Science* 1999, 286, 971-974

Chinese Hamster Ovary cells
overexpressing the human
INSULIN RECEPTOR

incubation with
insulin or test compounds

Immunopurification of the
heterotetrameric
INSULIN RECEPTOR

Assay for
tyrosine kinase activity



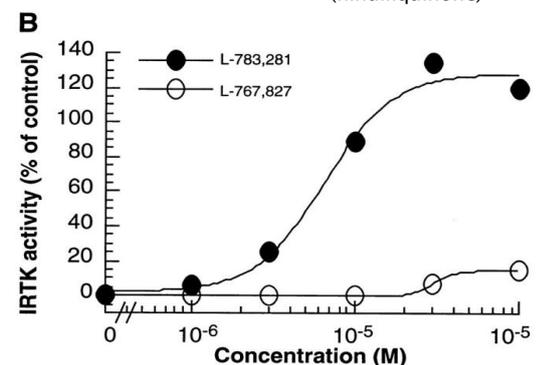
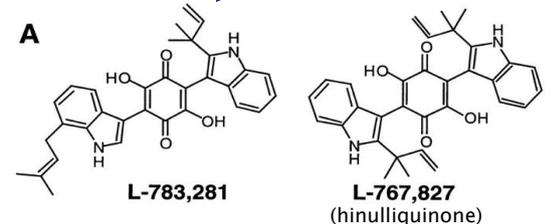
Enhancement of insulin-stimulated tyrosine kinase activation

Discovery of a Small Molecule Insulin Mimetic with Antidiabetic Activity in Mice

>50,000 mixtures of synthetic
compounds and natural products

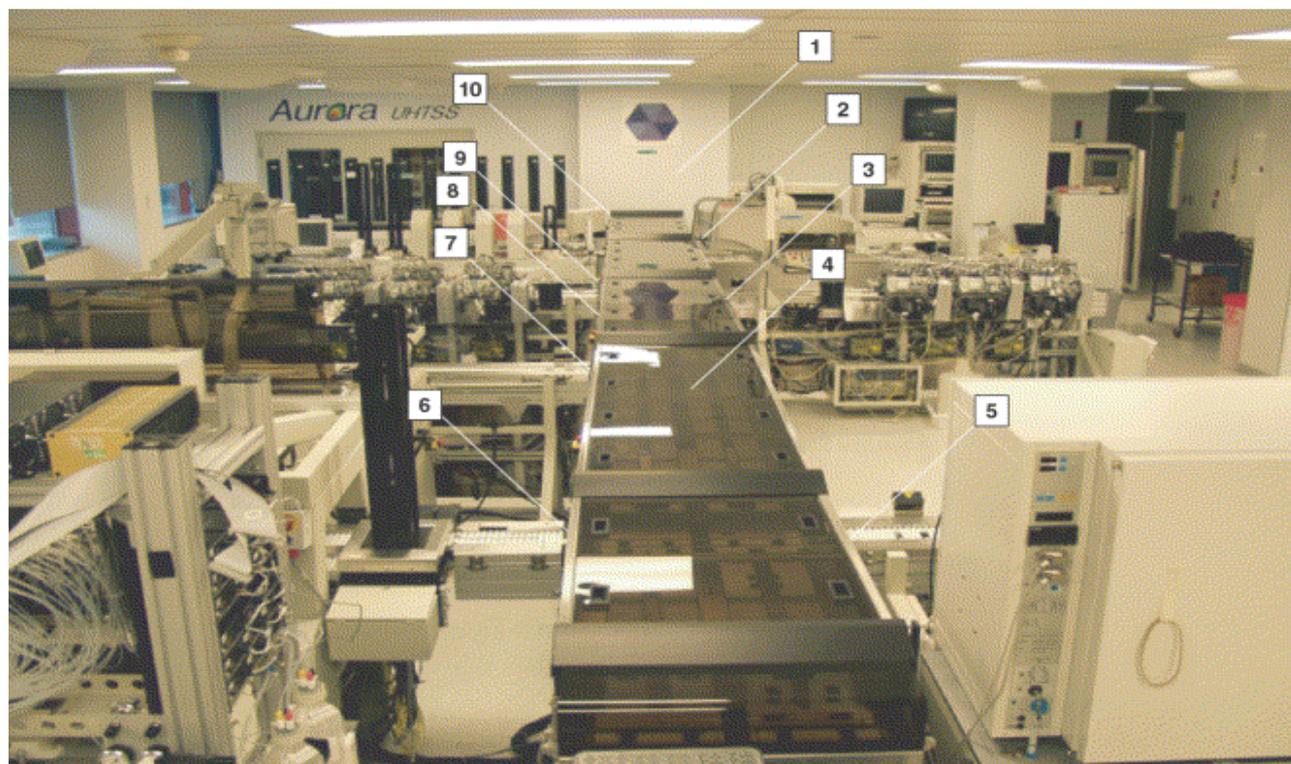
cell-based screening assay
96-well plates (150,000 cells/well)

Pseudomassaria sp.



Zhang et al. *Science* 1999, 284, 974-977

Sistema de *uHTS* automatizado en Bristol-Myers Squibb



- | | |
|--|---------------------------------------|
| (1) Compound store | (2) Hit-picking robot |
| (3) 3456 reagent dispensing robot | (4) Transport |
| (5) Incubators | (6) Piezo-electric distribution robot |
| (7) Topology compensating plate reader | (8) 1536 reagent dispensing robot |
| (9) Automated plate replicating system | (10) High-capacity stacking system |

Drug Discovery Today

Quimioteca de compuestos en Novartis



Los métodos *HTS* son ahora procedimiento de rutina

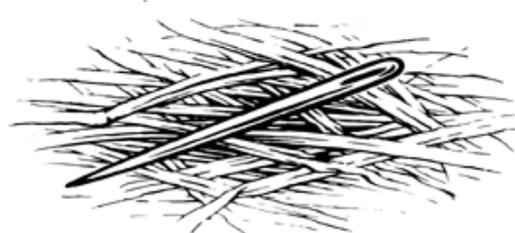
– Pros

- » permiten la detección de posibles “cabezas de serie” y clases estructurales
- » generan rápidamente una relación estructura-actividad (SAR) provisional
- » utilizan la colección histórica de compuestos de la compañía de forma eficaz

– Contras

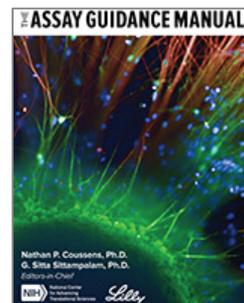
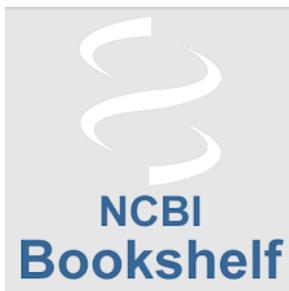
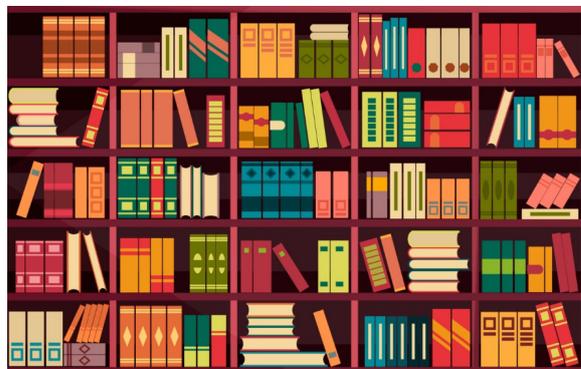
- » los laboratorios de *HTS* son caros de mantener
- » los cribados típicos cuestan \$100.000 - >\$1.000.000
- » consumen una parte importante de la valiosa colección histórica
- » las quimiotecas disponibles comercialmente son caras
- » “campo de minas” de patentes

Síndrome de la ‘Aguja en el Pajar’



- Se estima que se podrían sintetizar 10^{200} compuestos¹
- 28 millones de compuestos actualmente registrados (CAS)
- Se pueden cribar hasta 1 millón de compuestos frente a una diana utilizando tecnología *ultra-high throughput*
- Los químicos seleccionan 50-100 compuestos para su seguimiento
- Los químicos trabajan sobre estos compuestos, desarrollando compuestos nuevos, más potentes
- Los farmacólogos ensayan compuestos para obtener sus perfiles farmacocinéticos y toxicológicos
- Se seleccionan 1-2 compuestos como fármacos potenciales

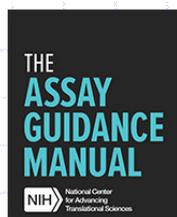
¹ Véase http://www.daylight.com/meetings/mug98/Nicholls/The_Hitch_Hiker.html



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>

Este **eBook** es un recurso completo y crucial para los investigadores que optimizan los ensayos para evaluar colecciones de moléculas con el objetivo general de desarrollar sondas que modulen la actividad de dianas biológicas, rutas de señalización o fenotipos celulares. Estas sondas podrían ser moléculas candidatas para una mayor optimización e investigación en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.

- Descripciones de los formatos de ensayo compatibles con el HTS y determinación de las SAR
- Selección y desarrollo de reactivos de ensayo óptimos
- Optimizaciones y resolución de problemas para los protocolos de ensayo con respecto a la sensibilidad, el rango dinámico, la intensidad de la señal y la estabilidad.
- Adaptaciones de ensayos para automatización y escalado a formatos de placas de microtitulación
- Instrumentación
- Fuentes de artefactos e interferencias de los ensayos
- Validación estadística de los parámetros de rendimiento del ensayo
- Ensayos secundarios para la validación de sondas químicas y refinamiento de las SAR
- Normas de datos para la notificación de los resultados de los ensayos de cribado y SAR
- Desarrollo y validación de ensayos *in vivo*
- Desarrollo y validación de ensayos para cribados de alto rendimiento basados en siRNA



*Un recurso completo y crucial para los investigadores que optimizan ensayos para evaluar colecciones de moléculas ("quimiotecas") con el objetivo general de desarrollar sondas que modulen la actividad de dianas biológicas, rutas de señalización o fenotipos celulares. Dichas sondas podrían ser candidatas a una mayor optimización e investigación en el **descubrimiento y desarrollo de fármacos**.*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>

***In vitro* Biochemical Assays**

- Validating Identity, Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations
- Basics of Enzymatic Assays for HTS
- **Receptor Binding Assays for HTS and Drug Discovery (Seminario 1)**
- **Mechanism of Action Assays for Enzymes (Seminario 2)**
- Assay Development for Protein Kinase Enzymes
- Protease Assays
- Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats
- Immunoassay Methods
- GTPγS Binding Assays
- Histone Acetyltransferase Assays in Drug and Chemical Probe Discovery

***In vitro* Cell-Based Assays**

***In vivo* Assay Guidelines**

Assay Artifacts and Interferences

Assay Validation, Operations and Quality Control

Assay Technologies

Instrumentation

Pharmacokinetics and Drug Metabolism

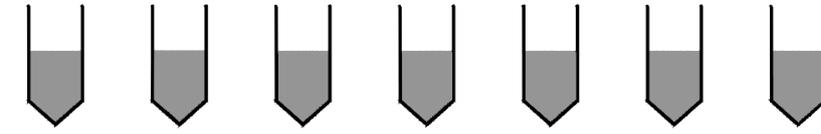
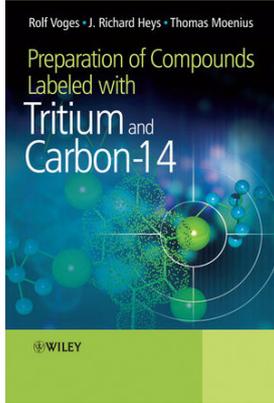
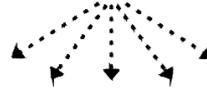
EXPERIMENTO DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDO ("BINDING")



Suspensión y homogenización



preparación de receptores (R)



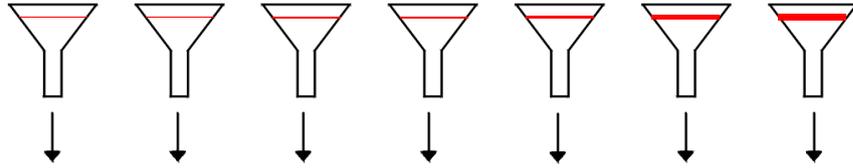
+ [L*]₁ [L*]₂ [L*]₃ [L*]₄ [L*]₅ [L*]_{n-1} [L*]_n

Ligando marcado radioactivamente

INCUBACIÓN

[L*R]₁ [L*R]₂ [L*R]₃ [L*R]₄ [L*R]₅ [L*R]_{n-1} [L*R]_n

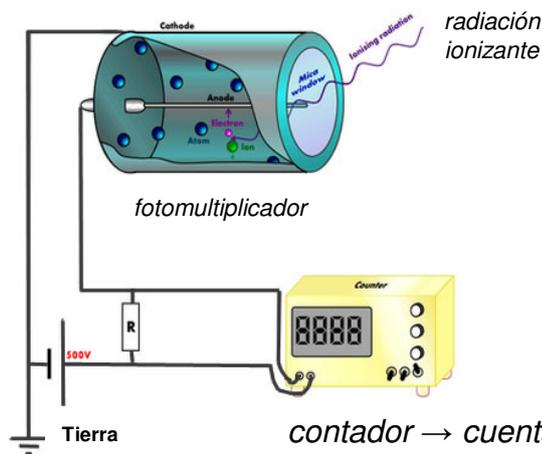
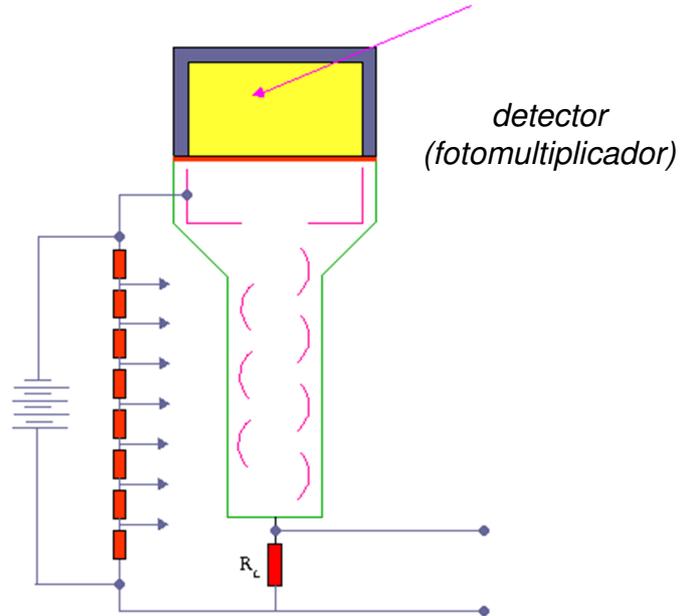
Complejo ligando*-receptor



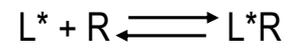
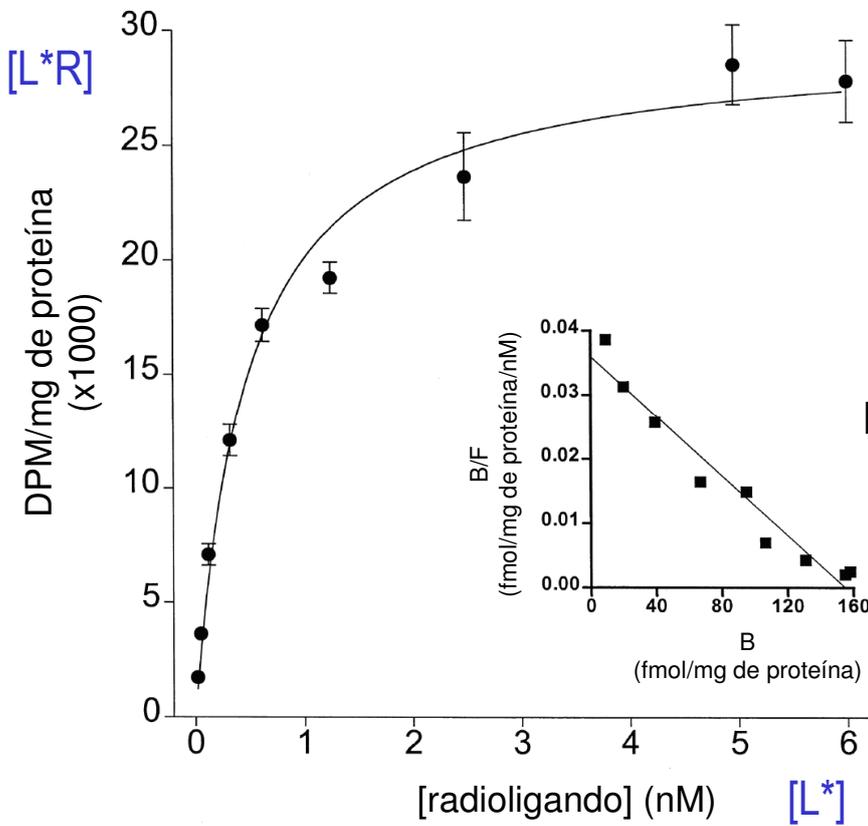
Ligando marcado no unido



CONTADOR DE CENTELLEO



contador → cuentas por minuto (cpm) o desintegraciones por minuto (dpm)



$$K_d = \frac{[L^*][R]}{[L^*R]}$$

$$[R] = [R_T] - [L^*R] = B_{\max} - B$$

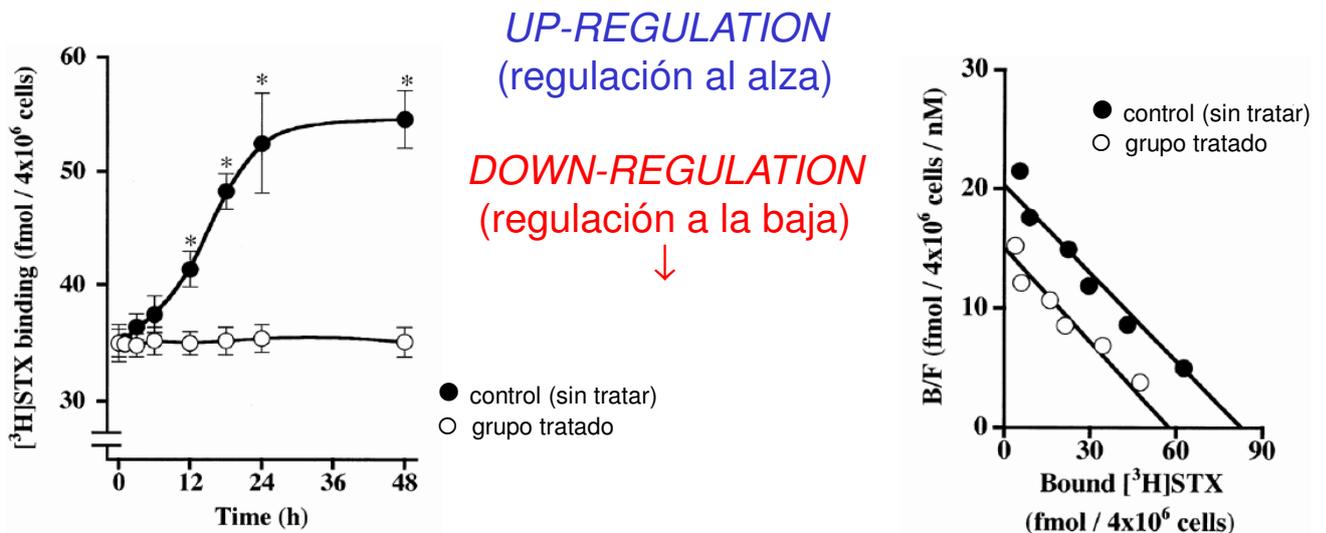
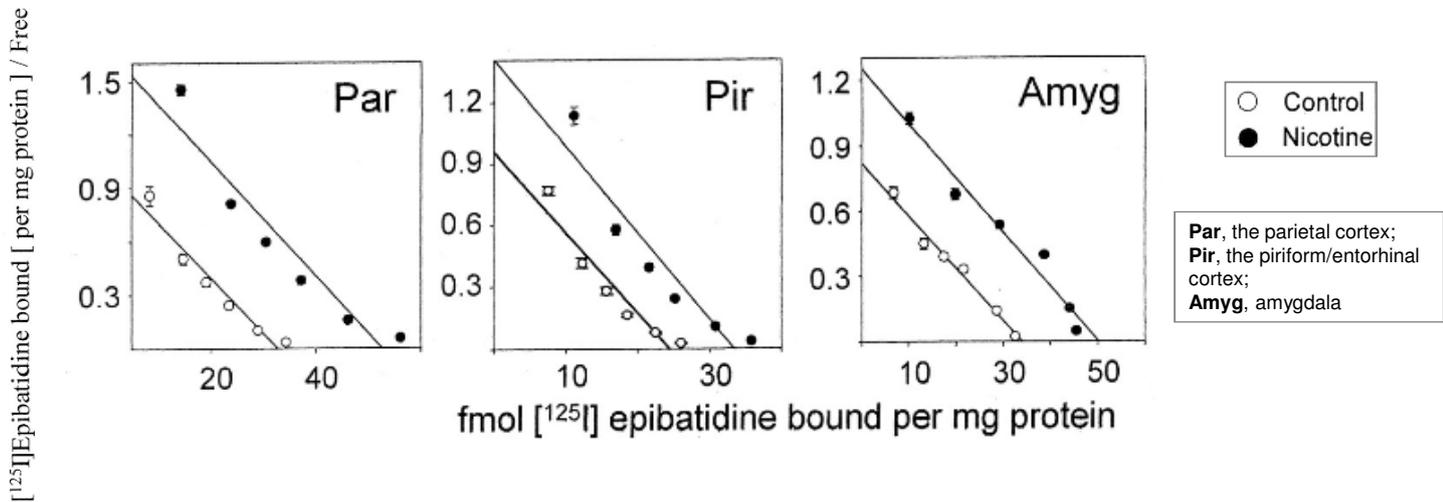
B = bound (unido)
F = free (libre)

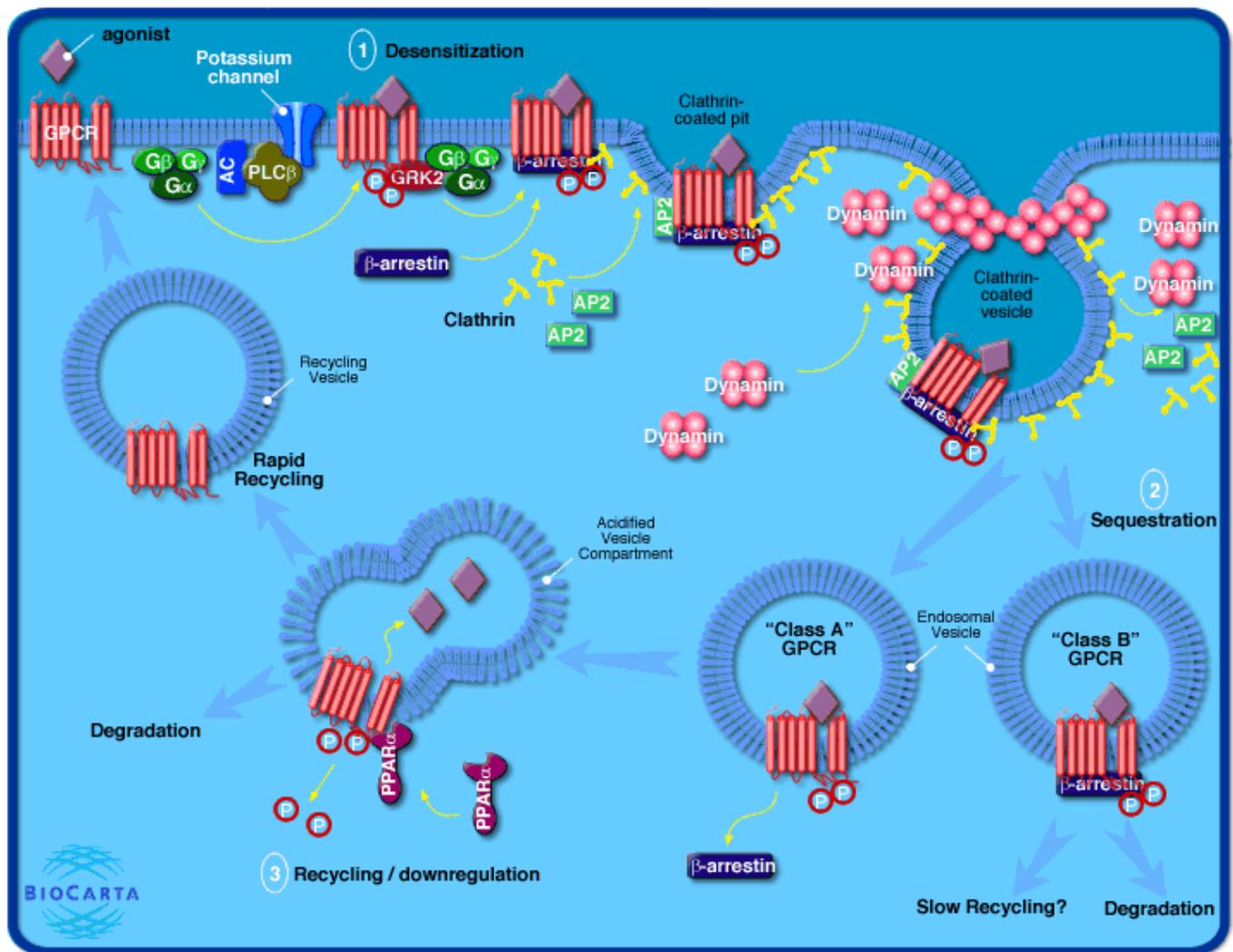
$$K_d = \frac{[L^*] \cdot ([R_T - L^*R])}{[L^*R]} = \frac{F \cdot (B_{\max} - B)}{B}$$

$$\frac{B_{\max} - B}{K_d} = \frac{B}{F}$$

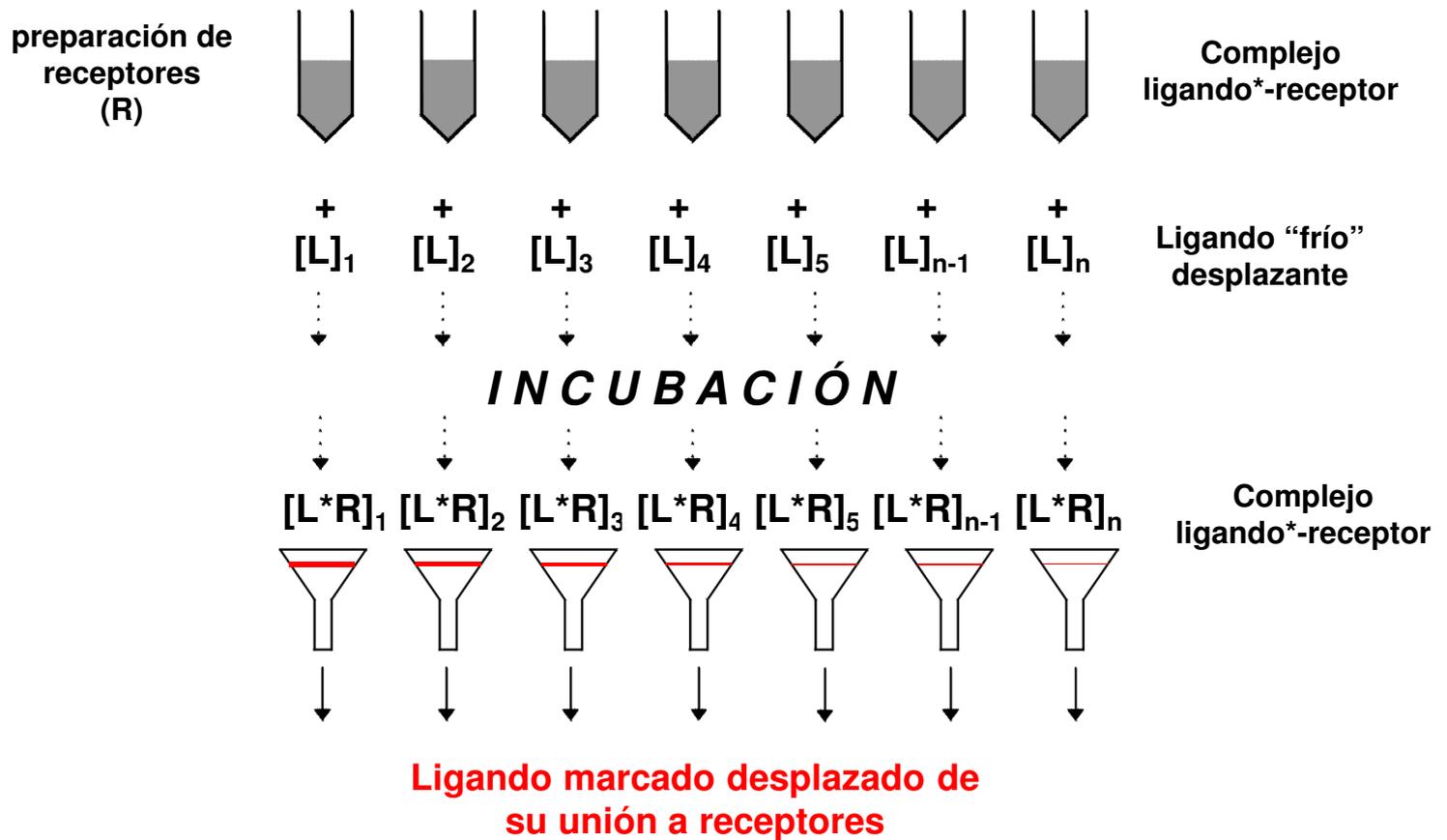
$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} B$$

Experimento de saturación con un radioligando. Se representan tanto la isoterma de adsorción de Langmuir (hipérbola) como la **transformación de Scatchard** (recta). DPM significa desintegraciones por minuto en el contador de centelleo y el valor está corregido para la fijación específica. Para este ligando resultan unos valores de $K_d = 0.38 \pm 0.03$ nM (a partir de la pendiente de la recta) y $B_{\max} = 152 \pm 25$ fmol/mg de proteína (punto de corte de la recta con el eje de abscisas, por extrapolación).

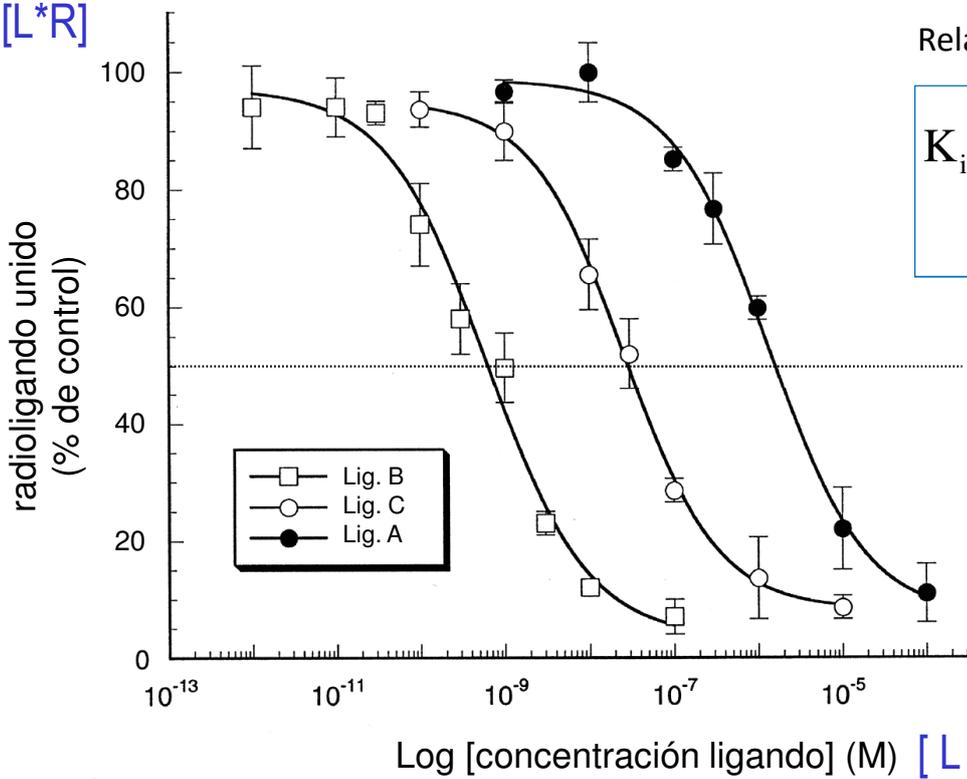




EXPERIMENTO DE DESPLAZAMIENTO DE RADIOLIGANDO



[L*R]



Experimento de desplazamiento de un radioligando (L*) unido a su receptor por una serie de moléculas no marcadas ("frías") que actúan como ligandos competidores (A, B y C). Nótese la escala logarítmica del eje de abscisas. La línea de puntos representa un desplazamiento del 50% de radioligando unido. El orden de afinidades por el receptor estudiado es B > C > A.

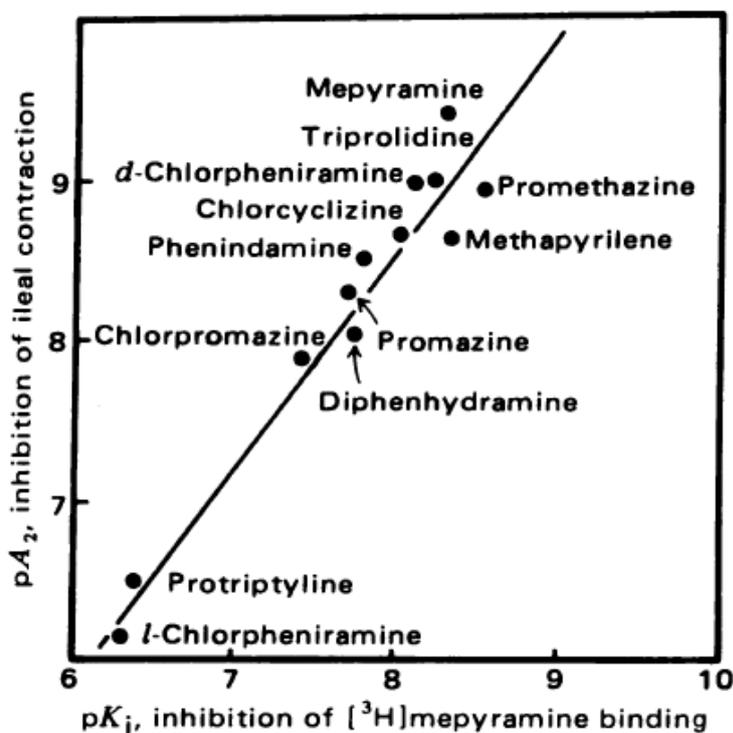


FIG. 3. Correlation of affinity of drugs at [3H]mepyramine binding receptor sites with their potencies in blocking histamine-induced guinea pig ileal contractions. pA_2 values were derived from published data (13-16). Slope = 1.4.

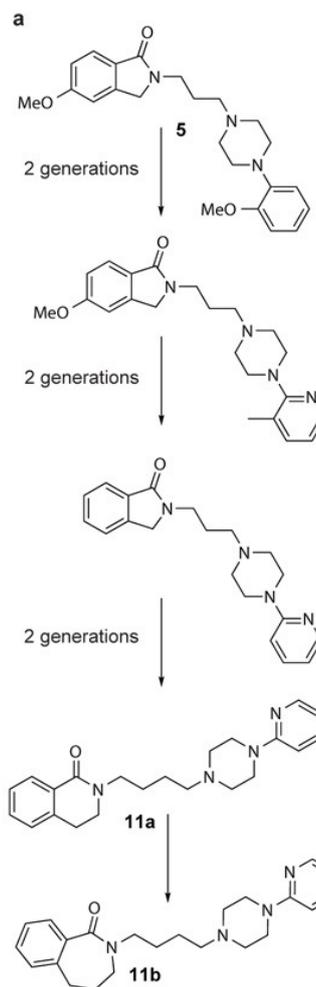
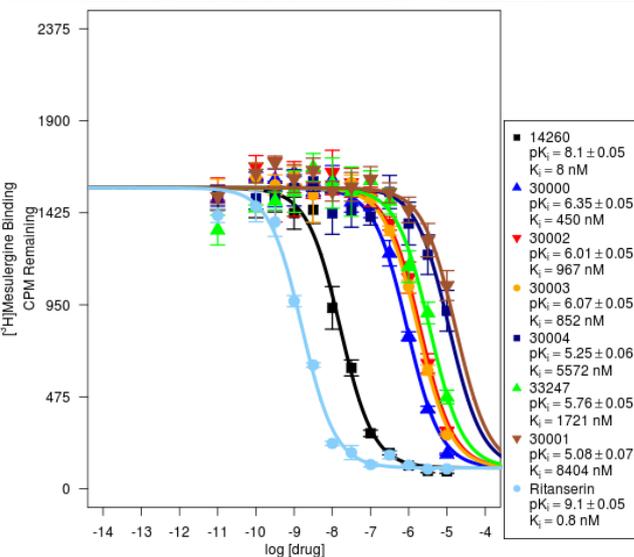
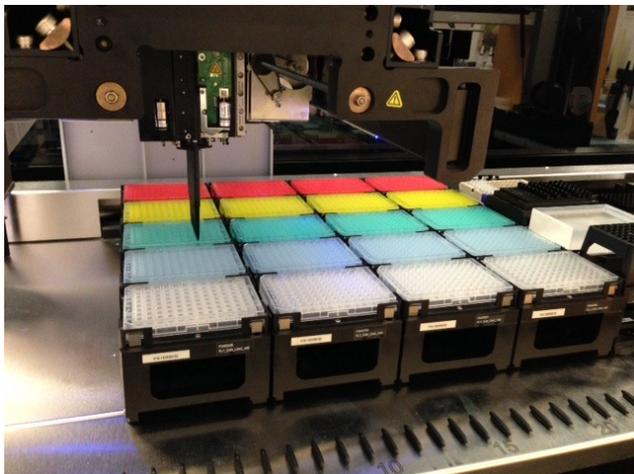
- **NOTA:** En la práctica, hay que tener en consideración la **unión no-específica** y corregir los cálculos

- **Material adicional sobre radioligandos:**

- http://www.slideshare.net/anakit_2408/radioligand-binding-studies
- <https://farmamol.web.uah.es/radioligands/radiolig.htm>
- http://farmamol.web.uah.es/PDF_files/Bases_inter_FR.pdf

- **Cribado farmacológico:**

- <http://www.hhmi.org/biointeractive/genomics/animations.html>
- <http://www.hhmi.org/biointeractive/vlabs/index.html>



Bayesian model score

	5	9a	9b	10a	10b	11a	11b
5-HT1A	88.2	67.6	62.8	64.0	75.8	67.4	53.3
α1A	90.5	44.6	27.4	36.8	101.6	95.8	73.3
α1B	91.4	47.0	32.6	40.1	103.4	92.9	69.4
α1D	103.5	74.4	67.3	69.1	92.6	78.1	63.1
D2	104.4	76.8	72.4	72.4	94.4	75.2	59.2
D3	78.3	35.5	28.9	29.1	77.9	55.3	70.2
D4	79.2	37.9	34.0	32.3	79.7	52.3	66.2

0 104.4

Experimental K_i (nM)

	5	9a	9b	10a	10b	11a	11b
5-HT1A	19	59.9	608.1	56	1367.0	152	115
α1A	1.5	117.2	649	78.4	14	1	13
α1B	1.3	216.8	656.7	209.6	5.8	1	9
α1D	0.9	11.1	76.6	14.2	25	4	6
D2	0.7	7.2	125.3	37.6	9.3	0.7	3.1
D3	4.0	555.4	1375.0	467.3	805.5	20	14.5
D4	1.2	866.6	2542.0	979.6	209.4	3	6.5

0.7 5000

Afinidades del **palonosetrón** por distintos receptores farmacológicos (ensayos de desplazamiento)

Receptor	radioligando	pK_i	Receptor	radioligando	pK_i
5-HT _{1A}	8-OH-DPAT	4.4 ± 0.1	Beta ₂	CGP-12177	< 4.0
5-HT _{1D}	5-HT	4.2 ± 0.1	Muscarínico M ₁	Pirenzepina	5.9 ± 0.1
5-HT _{2A}	Ketanserina	4.8 ± 0.2	Muscarínico M ₂	NMS	4.9 ± 0.1
5-HT _{2C}	Mesulergina	4.6 ± 0.3	Muscarínico M ₃	NMS	5.3 ± 0.1
5-HT ₃	Quipazina	10.4 ± 0.2	Opioide kappa	U69593	4.2 ± 0.4
5-HT capt.	Paroxetina	5.3 ± 0.1	Opioide mu	RX783006	3.7 ± 0.2
Dopamina D ₁	SCH23390	< 4.0	Opioide delta	DPDPE	4.0 ± 0.4
Dopamina D ₂	Espiperona	< 4.0	GABA _A	GABA	< 4.0
Alfa _{1A}	Prazosina	5.6 ± 0.3	GABA _A /BDZ	Diazepam	< 4.0
Alfa _{1B}	Prazosina	5.4 ± 0.1	GABA _A /Picrotoxina	TBPS	< 4.0
Alfa _{2A}	Rauwolscina	5.4 ± 0.2	canal NMDA	MK-801	< 4.0
Alfa _{2B}	Rauwolscina	5.4 ± 0.1	canal Ca ²⁺	PN200-10	< 4.0
Beta ₁	CGP-12177	< 4.0	canal Na ⁺	Saxitoxina	< 4.0

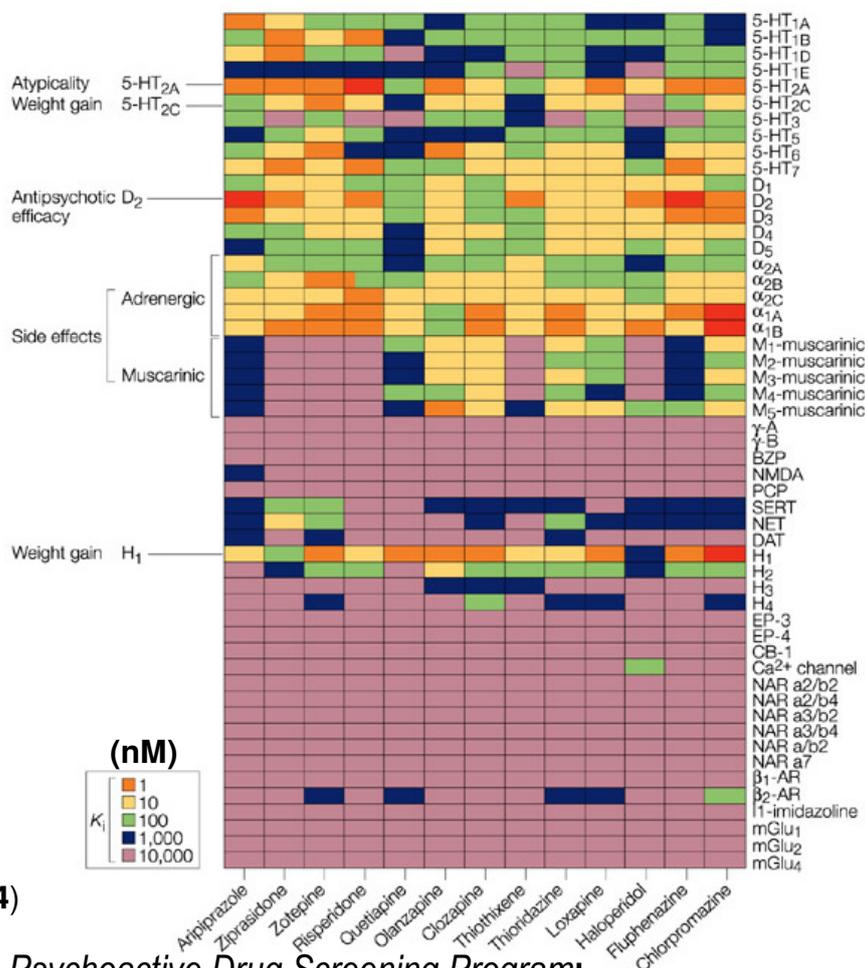
Alta selectividad por el 5-HT₃

$pK_i = -\log K_i$

Wong et al., *BJP* 1995

¿“Balas mágicas” o “perdigones mágicos”?

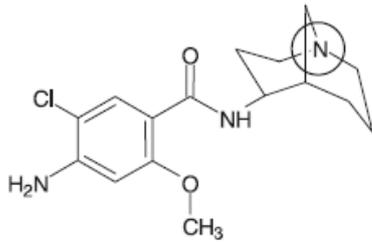
Representación gráfica de los valores relativos de **afinidad** (K_i) por **diversos receptores** de una serie de psicofármacos, incluyendo antipsicóticos atípicos (clozapina, aripiprazol, ziprasidona, zotepina, quetiapina, olanzapina, risperidona) y típicos (haloperidol, clorpromazina)



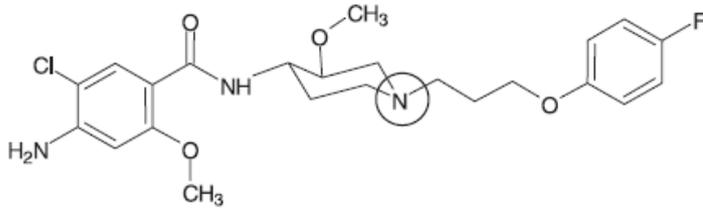
Nat Rev Drug Discov. 3(4):353-359 (2004)

National Institute of Mental Health (USA) Psychoactive Drug Screening Program:
Base de Datos PDSP (<https://pdsf.unc.edu/databases/top100rec.php>)

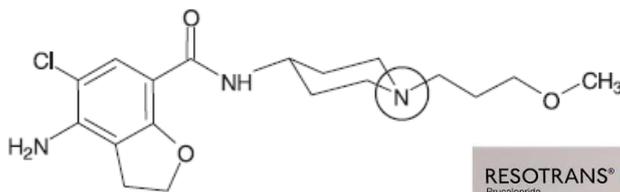
5-HT₄ receptor agonists: *similar but not the same*



Renzapride



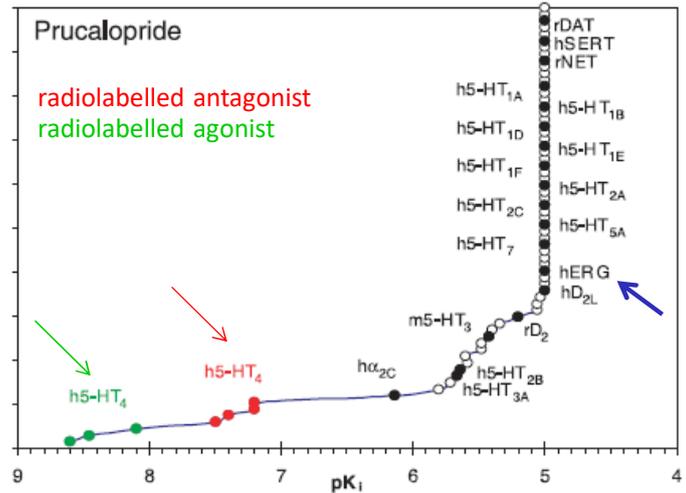
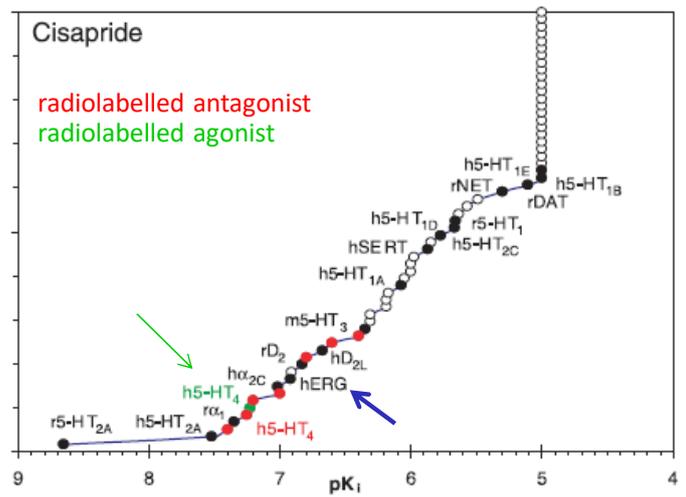
Cisapride



Prucalopride



Neurogastroenterol. Motil. 20, 99–112 (2008)



Base de datos de afinidades de unión medidas experimentalmente



The Binding Database

Home Info Download About us Email us Contribute data Web Services Beta Site

Please try our [new beta-test BindingDB site!](#)

- Responsive design for better display on tablets and phones
- New tool to filter search results by e.g. target, article, affinity, xtal structure
- Simplified new look

Access coronavirus binding data on our covid page [here](#).

BindingDB is a public, web-accessible database of measured binding affinities, focusing chiefly on the interactions of protein considered to be drug-targets with small, drug-like molecules. As of May 27, 2022, BindingDB contains 41,296 Entries, each with a DOI, containing 2,519,702 binding data for 8,810 protein targets and 1,080,101 small molecules.

There are 5,988 protein-ligand crystal structures with BindingDB affinity measurements for proteins with 100% sequence identity, and 11,442 crystal structures allowing proteins to 85% sequence identity.

You can also use BindingDB data through the Registry of Open Data on AWS: <https://registry.opendata.aws/binding-db>.

Simple Search

Article Titles, Authors, Assays, Compound Names, Target Names

Use ? for single-letter wild-card or * for general wild-card.
For example, "adeny*" or "adeny?". Query cannot start with wild card.

Advanced Search

Combine multiple search criteria, such as chemical structures, target names, and numerical affinities; restrict searches by data source, such as BindingDB, ChEMBL, PubChem, and Patents.

[myBDB logout](#)

[Search and Browse](#)

Target

[Sequence](#)

[Name &](#)

[Ki IC50 Kd EC50](#)

[Rate constants](#)

[ΔG° ΔH° -TΔS°](#)

[pH \(Enzymatic Assay\)](#)

[pH \(ITC\)](#)

[Substrate or Competitor](#)

[Compound Mol. Wt.](#)

[Chemical Structure](#)

[Pathways](#)

[Source Organism](#)

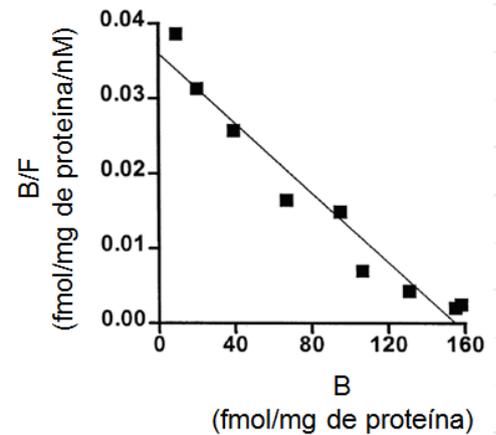
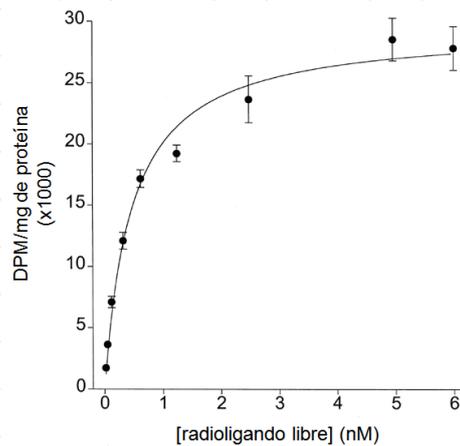
[Number of Compounds](#)

[Monomer List in csv](#)

[Help](#)

<http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>

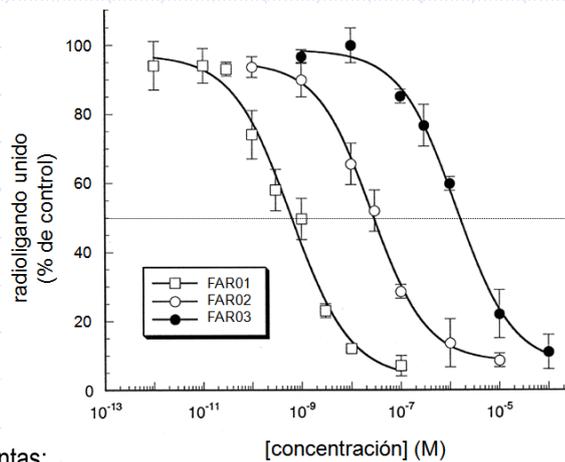
ENUNCIADO. A partir de los resultados obtenidos en el contador de centelleo para un experimento de fijación de un ligando marcado radiactivamente (L*) a una preparación de membranas celulares se han elaborado las siguientes gráficas:



Se pide:

- explicar el significado de DPM y definir la forma de la curva obtenida en la representación del lado izquierdo (2 puntos).
- explicar el significado de B/F y B en la gráfica de la derecha, así como el nombre de esta transformación matemática y la forma de derivarla (5 puntos).
- explicar qué parámetros de la unión ligando-receptor se pueden deducir a partir de estos datos, proponiendo unos valores aproximados para los mismos (3 puntos).

ENUNCIADO: En una preparación de membranas celulares que contienen **adrenoceptores β** hemos realizado un experimento de desplazamiento de radioligando unido para los fármacos **FAR01**, **FAR02** y **FAR03**. Los datos obtenidos se han representado gráficamente de la siguiente forma:



A la vista de estas curvas, responda a las siguientes preguntas:

- ¿Cómo se denomina este tipo de representación y por qué se realiza de este modo? (2 puntos):
Representación semilogarítmica. Al representar los logaritmos de las concentraciones se comprime el eje de abscisas.
- ¿Cómo se llama el tipo de curva obtenida? (1 punto):
Curva sigmoidea.
- ¿Qué propiedad de los fármacos estudiados nos permite caracterizar este tipo de experimento? (2 puntos):
La afinidad por el receptor adrenérgico beta.
- ¿Cómo se cuantifica generalmente la propiedad a la que se alude en la pregunta anterior y en qué unidades viene dada? (2 puntos):
Determinando la constante de disociación (K_d) o, en este caso, la constante de inhibición (K_i), que se puede obtener a partir de las CI_{50} calculadas a partir de la gráfica y los valores conocidos de la K_d del radioligando y su concentración. Tanto la K_d como la K_i tienen unidades de concentración (M).
- Si tuviera que comparar los tres fármacos, ¿qué podría afirmar sobre ellos? (2 puntos):
Las afinidades por el receptor decrecen en el orden FAR01 > FAR02 > FAR03.
- A partir de estos datos, ¿qué puede deducir del comportamiento farmacológico de estas tres moléculas? (1 punto):
Sólo podemos afirmar que presentan afinidad por el receptor pero no podemos saber si se comportan como agonistas o como antagonistas.

Pregunta. Se han llevado a cabo ensayos de desplazamiento de unión de radioligandos utilizando palonosetrón como ligando frío y una preparación de membranas celulares procedentes de corteza cerebral de rata. Los datos obtenidos se han recopilado en la siguiente tabla:

Receptor/ Diana	Radioligando	pK_i^*
5-HT _{1A}	8-OH-DPAT	4.4 ± 0.1
5-HT _{1D}	5-HT	4.2 ± 0.1
5-HT _{2A}	ketanserina	4.8 ± 0.2
5-HT _{2C}	mesulergina	4.6 ± 0.3
5-HT ₃	quipazina	10.4 ± 0.2
SERT	paroxetina	5.3 ± 0.1

Conteste brevemente a las siguientes preguntas en el espacio destinado para ello:

(1) ¿Cuál es la forma más frecuente de marcar radiactivamente un ligando y qué instrumento se utiliza para medir la radiactividad en este tipo de ensayos? (2 puntos):

Con un isótopo radiactivo, generalmente tritio (³H). Un contador de centelleo.

(2) ¿Cuál es el agonista endógeno que se une a las dianas estudiadas y qué significa el acrónimo 5-HT? (1 punto):

La serotonina; 5-HT significa 5-hidroxitriptamina.

(3) Describa brevemente el tipo de dianas/receptores sometidos a estudio en este trabajo (2 puntos):

Los cuatro primeros receptores son metabotrópicos, es decir, funcionan acoplados a proteínas G; el 5-HT₃ es ionotrópico; y SERT es el transportador de serotonina responsable de la recaptación.

(4) ¿Por qué razón se han utilizado distintos radioligandos? (1 punto):

Cada radioligando presenta una mayor afinidad por un determinado receptor.

(5) ¿Cuál es el significado de pK_i y sobre qué propiedad del fármaco nos proporciona información cuantitativa? (2 puntos):

$pK_i = -\log K_i$ y cada valor de K_i representa la constante de disociación del palonosetrón para ese tipo de receptor (la i de K_i hace referencia a la CI_{50} de la que deriva). El pK_i nos proporciona una medida de la afinidad del ligando frío (palonosetrón) por cada tipo de receptor estudiado.

(6) A partir de estos datos, ¿qué puede (y qué no puede) deducir del comportamiento farmacológico del palonosetrón? (1 punto):

Podemos afirmar que palonosetrón es un ligando selectivo del receptor 5-HT₃, ya que su afinidad por el mismo es más de 5 órdenes de magnitud superior a la que presenta por las otras dianas estudiadas. Sin embargo, de los datos proporcionados por este tipo de ensayo no podemos deducir si es agonista o antagonista.

(7) Utilidad clínica del palonosetrón (1 punto): *Prevención y tratamiento de náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia antineoplásica. Se trata de un antiemético de la clase de los setrones (antagonistas 5-HT₃).*

*Los valores tabulados son la media ± error estándar de tres experimentos independientes (Brit. J. Pharmacol. 114(4): 851-859, 1995).

Pregunta. La K_D para la unión específica de [³H]astemizol a membranas de células CHO que expresan el gen *HERG* es 3,6 nM y el valor calculado de $B_{máx}$ es de 7,2 pmol/mg de proteína. Cuando se han incubado estas mismas membranas a las que se ha unido [³H]astemizol con concentraciones crecientes de (a) astemizol "frío" y (b) cisaprida, se han obtenido las siguientes representaciones gráficas:

Conteste brevemente a las siguientes preguntas en el espacio destinado para ello:

(1) ¿Qué significan [³H] y "frío" en referencia al astemizol? (1 punto)

[³H] delante del nombre de la molécula significa que uno o varios de los átomos de hidrógeno del astemizol ha(n) sido sustituido(s) por tritio, el isótopo radiactivo del H, para disponer de un radioligando. El astemizol "frío" no es radioactivo.

(2) ¿Qué significa $B_{máx}$ y cómo se ha calculado su valor? (2 puntos)

*$B_{máx}$ es la concentración molar de receptores totales (proteína *HERG* que hemos producido en las células de ovario de hámster chino-CHO) y se obtiene a partir del punto de corte de la recta con el eje de abscisas en la representación de Scatchard.*

(3) ¿Qué nombre recibe este tipo de experimento? (1 punto):

Experimento de desplazamiento de radioligando unido, en este caso del astemizol marcado radiactivamente por parte de los ligandos fríos astemizol y cisaprida, que actúan como competidores.

(4) ¿Cómo se llama este tipo de curva y por qué se han tomado logaritmos en el eje de abscisas? (2 puntos)

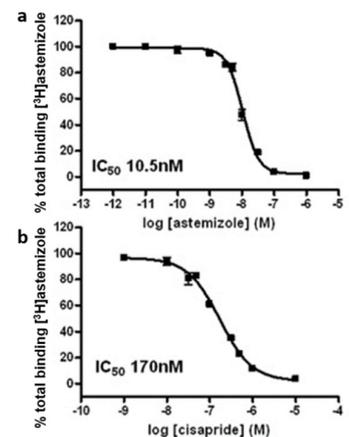
Se denominan curvas sigmoideas y se obtienen al realizar una representación semilogarítmica con objeto de contraer el eje de abscisas y cubrir un amplio intervalo de concentraciones en una escala más reducida.

(5) ¿Cómo se relacionan los valores de CI_{50} obtenidos con las afinidades de estas sustancias por la proteína *HERG*? (2 puntos):

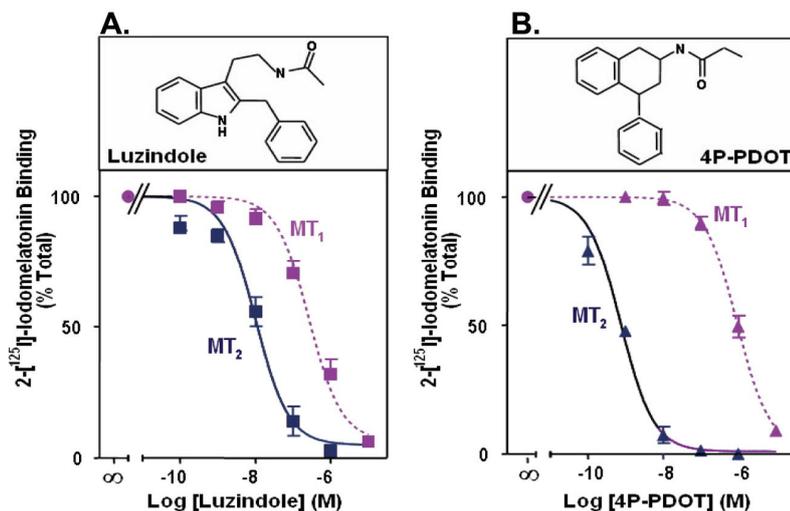
*Los valores de CI_{50} son directamente proporcionales a las constantes de disociación de estas moléculas de la proteína *HERG*, las cuales con inversamente proporcionales a sus afinidades.*

(6) Describa el tipo de diana sometida a estudio en este trabajo (*HERG*) y las consecuencias de su bloqueo (2 puntos) [puede continuar en el reverso]:

*El nombre *HERG* proviene de "human ether-a-go-go-related gene", un gen humano que codifica un canal de potasio ($K_{v1.1}$) cuyo bloqueo produce una ralentización de la repolarización del ventrículo, con prolongación del intervalo QT en el ECG, lo que puede producir "torsade de pointes" y muerte súbita. Por esta razón fueron retirados del mercado astemizol, cisaprida, terfenadina, grepafloxacino y otros fármacos.*



ENUNCIADO. SE HAN INCUBADO MEMBRANAS CELULARES QUE CONTIENEN RECEPTORES MT_1 Y MT_2 PARA LA MELATONINA (MT) CON UNA CONCENTRACIÓN FIJA DE 2-[¹²⁵I]YODO-MT EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DOS MOLÉCULAS: (A) LUZINDOL Y (B) 4-FENIL-PROPIONAMIDA TETRALINA (4P-PDOT). LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DATOS HA DADO LUGAR A LAS SIGUIENTES CURVAS:



Responda a las siguientes preguntas (utilizando solo el espacio asignado):

a) ¿QUÉ NOMBRE RECIBE ESTE TIPO DE EXPERIMENTO Y CUÁL ES SU FINALIDAD? ¿QUÉ PROPIEDAD DE LAS MOLÉCULAS PERMITE CUANTIFICAR? (2 puntos).

→
→

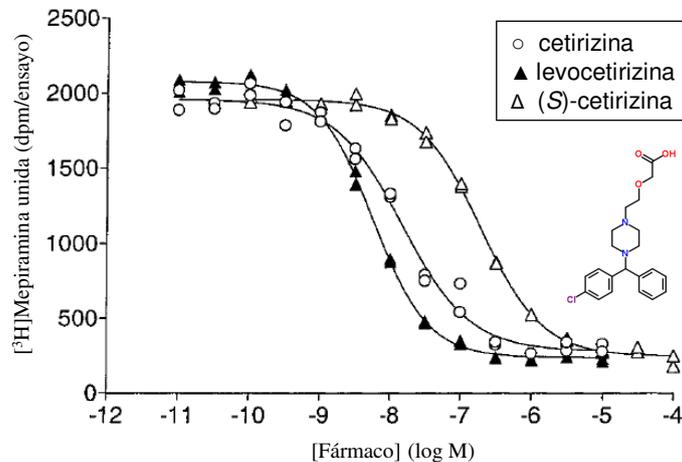
b) A PARTIR DE LAS CURVAS MOSTRADAS EN LAS GRÁFICAS A Y B, CUANTIFIQUE NUMÉRICAMENTE (DE FORMA APROXIMADA) LA PROPIEDAD A LA QUE SE ALUDE EN EL APARTADO a) PARA LUZINDOL Y 4P-PDOT (3 puntos).

→
→

c) ¿QUÉ **CONCLUSIONES** PUEDE EXTRAER CUANDO COMPARA LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA ESTAS DOS MOLÉCULAS? (5 puntos).

ENUNCIADO. Incubamos una preparación de membranas de células CHO que expresan el gen del **receptor H₁ humano** con 3,5 nM de [³H]mepiramina durante 60' a 37°C. Al cabo de este tiempo, añadimos a tres series de alícuotas de esta preparación concentraciones crecientes, bien de **cetirizina** (mezcla racémica), o bien de cada uno de sus correspondientes enantiómeros, y dejamos incubar durante 3 h. Cuando, tras filtrar, determinamos la radioactividad residual en esas membranas celulares y representamos los datos, obtenemos las curvas mostradas en la figura adjunta.

Responda a las siguientes preguntas (utilizando solo el espacio asignado en esta página):



(1) ¿Qué significan [³H] y dpm (eje de ordenadas en la gráfica)? ¿Cómo se denomina el instrumento que nos permite medir la radioactividad? (2 puntos):

→
→

(2) ¿Qué nombre recibe este tipo de experimento y cuál es la propiedad de estos fármacos que nos permite caracterizar? (1 punto):

→
→

(3) A partir de la gráfica, cuantifique esta propiedad –de forma aproximada– para cada uno de los fármacos estudiados (en unidades de nM) y explique la relación existente entre esta propiedad, el parámetro calculado anteriormente y la constante de disociación (3 puntos):

- cetirizina:

- levocetirizina:

- (S)-cetirizina:

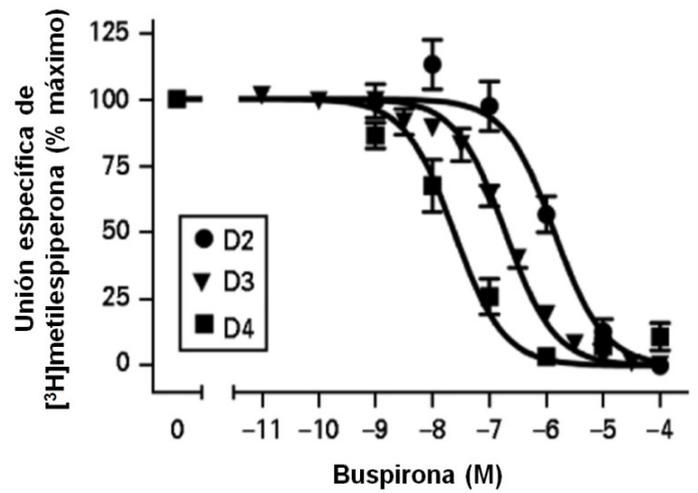
→

(4) ¿Qué podemos concluir al comparar los valores obtenidos para los tres fármacos y qué relevancia tiene esta conclusión desde un punto de vista terapéutico? (4 puntos):

→

ENUNCIADO. Se han incubado alícuotas de tres preparaciones de membranas celulares diferentes, cada una de las cuales contiene un tipo determinado de receptor de dopamina (concretamente **D2**, **D3** y **D4**), con una misma concentración de [^3H]metilesipiperona. Posteriormente hemos añadido a cada serie de tubos concentraciones crecientes de **buspirona** y determinado la radioactividad residual en esas membranas. A la derecha aparece la representación gráfica de los datos obtenidos.

Responda a las siguientes preguntas (utilizando solo el espacio asignado en esta página):



(1) ¿Qué significa [^3H] y cómo se denomina este tipo de experimento? (1 punto):

→
→

(2) Explique por qué se representa el eje de abscisas de este modo e indique el nombre que recibe el tipo de curva obtenida (1 punto):

(3) ¿Qué propiedad(es) de la buspirona nos permite caracterizar este tipo de experimento? (1 punto):

(4) Describa el parámetro que, a partir de la gráfica, permite cuantificar la propiedad a la que se alude en la pregunta anterior y cuantifique - de forma aproximada - su valor para cada tipo de receptor, incluyendo unidades (3 puntos):

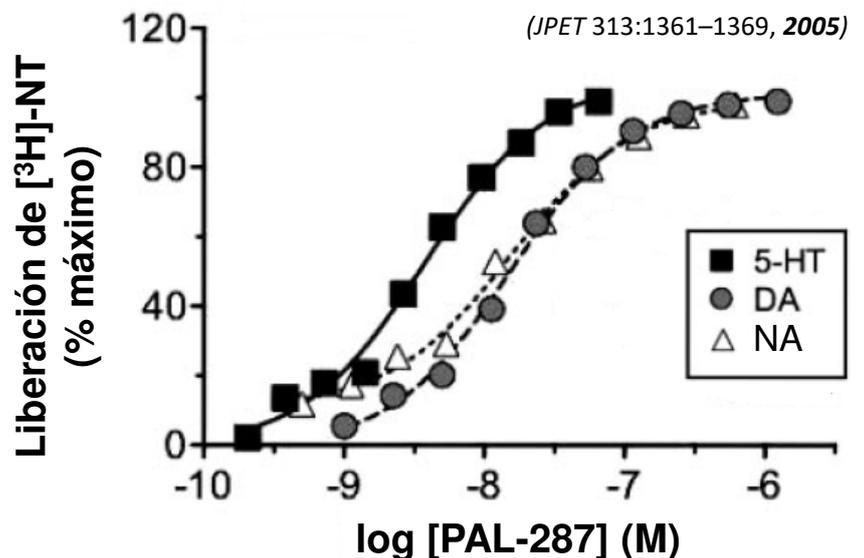
(5) Si tuviera que comparar los tres tipos de receptores en relación con la buspirona, ¿qué podría afirmar sobre ellos? (2 puntos):

(6) A partir de estos datos, ¿qué puede (y qué no puede) deducir del comportamiento farmacológico de la buspirona? (2 puntos):

Pregunta. Durante la búsqueda de un compuesto no-anfetamínico capaz de aliviar el síndrome de abstinencia a psicoestimulantes y carente de efectos adversos, se identificó el compuesto **PAL-287**. Para evaluar los efectos de esta molécula sobre la liberación de distintos neurotransmisores (NTs) se incubaron sinaptosomas procedentes de distintas regiones cerebrales de rata con soluciones de NTs etiquetados con tritio.

En la figura adjunta se muestran las curvas dosis-respuesta para la liberación de cada NT estudiado mediada por los transportadores de dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT).

Responda a las siguientes preguntas (utilizando solo el espacio asignado en esta página):



(1) ¿Qué nombre reciben este tipo de curva y este tipo de representación? (1 punto):

- curva:

- representación:

(2) ¿Por qué se toman logaritmos en el eje de abscisas? (1 punto):

(3) Cuantifique gráficamente -de forma aproximada y en unidades de nM- las CE_{50} de PAL-287 para cada uno de los transportadores estudiados, cuyos acrónimos aparecen debajo (4 puntos):

- DAT:

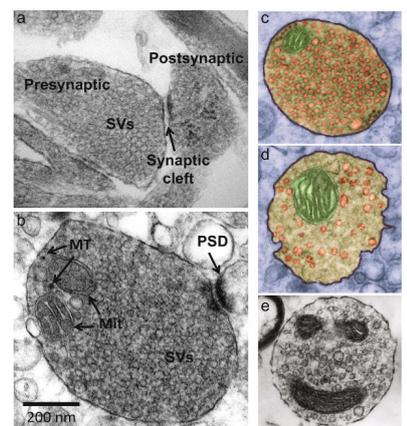
- NET:

- SERT:

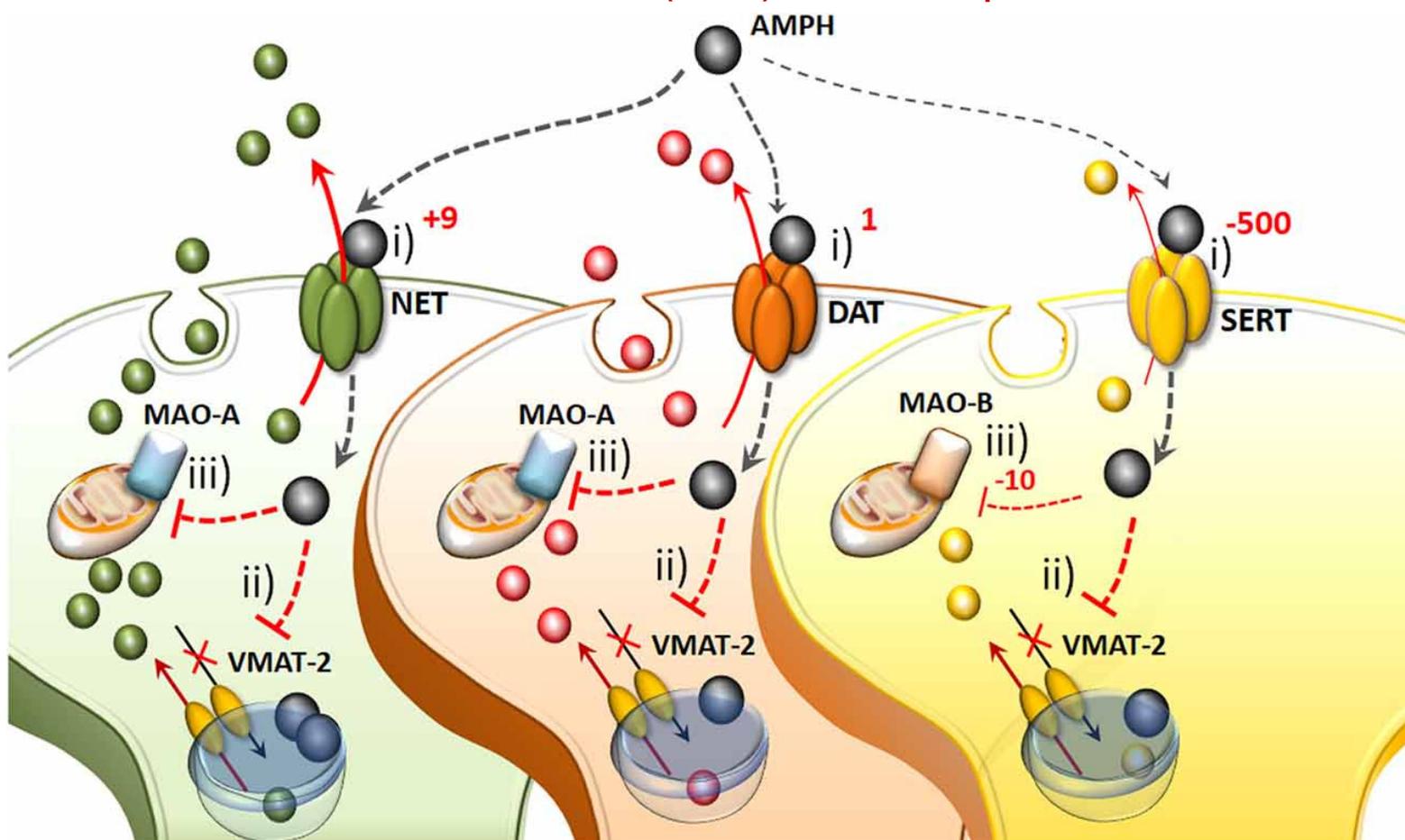
(4) ¿Por qué se denomina NET el segundo de estos transportadores? (1 punto):

(5) ¿Cuál es el significado de la CE_{50} en este caso? (1 punto):

(6) ¿Qué podemos concluir al comparar los valores obtenidos para PAL-287 sobre los tres transportadores estudiados? (2 puntos):

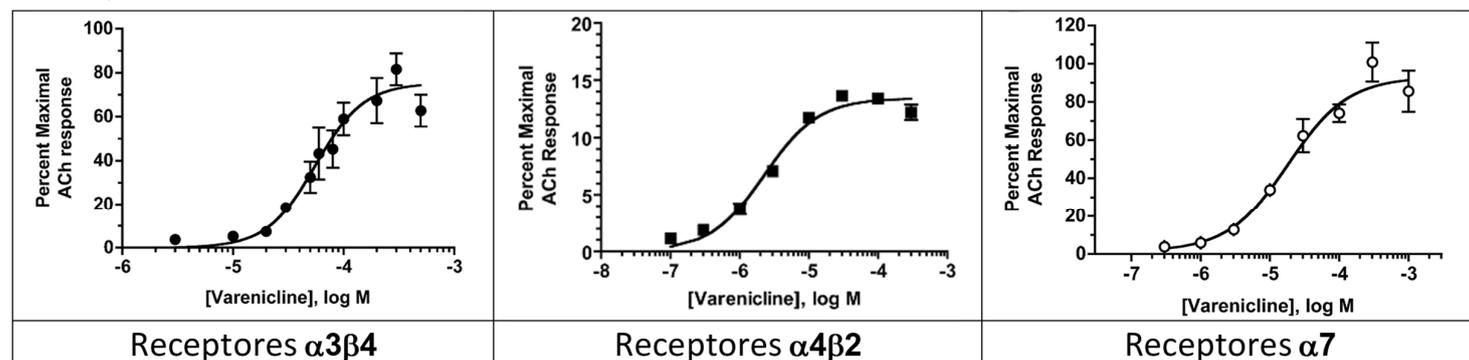


Mecanismos moleculares de la amfetamina (AMPH) en neuronas que contienen monoaminas



Ferrucci *et al.* The Effects of Amphetamine and Methamphetamine on the Release of Norepinephrine, Dopamine and Acetylcholine From the Brainstem Reticular Formation. *Front Neuroanat.* 13:48 (2019)

ENUNCIADO. SE HAN UTILIZADO OVOCITOS TRANSFECTADOS QUE MUESTRAN EN SUS MEMBRANAS DISTINTAS SUBUNIDADES DE RECEPTORES NICOTÍNICOS COLINÉRGICOS DE RATA PARA ESTUDIAR EN LOS MISMOS, MEDIANTE AMPEROMETRÍA EN PARCHÉ, LAS CORRIENTES EVOCADAS POR APLICACIÓN DE ACETILCOLINA (ACh) Y VARENICLINA (Var). LAS RESPUESTAS A Var SE NORMALIZARON CON RESPECTO A LA RESPUESTA CONSEGUIDA CON ACh, DE MODO QUE LAS GRÁFICAS REPRESENTAN EL EFECTO* COMO PORCENTAJE DE LA RESPUESTA MÁXIMA OBTENIDA CON ACh:



*Nótese que los intervalos que cubren ambos ejes NO son los mismos en las 3 gráficas.

~Los valores son la media \pm error estándar (*Mol. Pharmacol.* 70(3):801-805, 2006).

(1) ¿Qué nombre recibe el tipo de curvas mostradas y por qué se representa de este modo el eje de abscisas? (1 punto):

Curvas sigmoideas. Se representan los logaritmos de las concentraciones molares del fármaco para contraer la escala del eje de abscisas, de ahí el nombre de representación semilogarítmica.

(2) Cuantifique para cada tipo de receptor, de forma aproximada y en unidades de μM , la potencia de Var expresada como CE_{50} (2 puntos):

- Receptores $\alpha 3\beta 4$: $CE_{50} \approx 55 \mu\text{M}$ ($\approx 5,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)
 - Receptores $\alpha 4\beta 2$: $CE_{50} \approx 2 \mu\text{M}$ ($\approx 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$)
 - Receptores $\alpha 7$: $CE_{50} \approx 20 \mu\text{M}$ ($\approx 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)

(3) El orden de potencias de mayor a menor, por tanto, es (1 punto): $\alpha 4\beta 2 > \alpha 7 > \alpha 3\beta 4$.

(4) Compare las eficacias de Var (relativas a ACh) en cada uno de los subtipos de receptores (2 puntos):

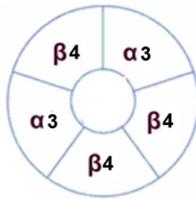
- Receptores $\alpha 3\beta 4$: $\approx 75\%$ ($\approx 0,75$)
 - Receptores $\alpha 4\beta 2$: $\approx 13\%$ ($\approx 0,13$)
 - Receptores $\alpha 7$: $\approx 90\%$ ($\approx 0,9$)

(5) A partir de los datos del apartado (4), ¿cómo clasificaría farmacológicamente a Var en cada uno de estos subtipos de receptor? (2 puntos):

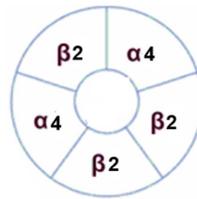
- Receptores $\alpha 3\beta 4$: *agonista parcial*
 - Receptores $\alpha 4\beta 2$: *agonista parcial débil*
 - Receptores $\alpha 7$: *agonista completo*

(6) En el reverso de esta página, dibuje un esquema de cada uno de estos tipos de receptores y razone por qué este perfil farmacológico puede hacer de Var un fármaco útil para la deshabituación tabáquica (2 puntos):

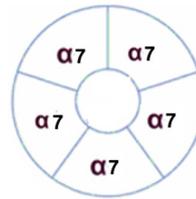
HETEROPENTÁMERO



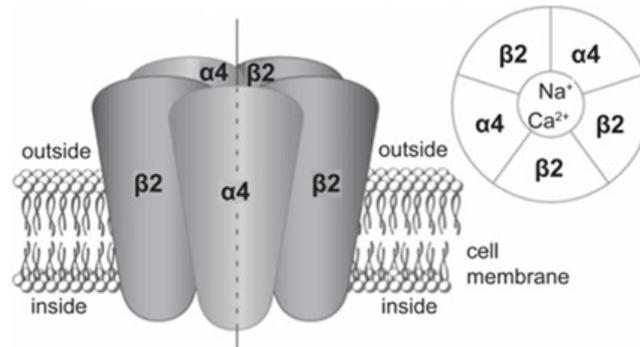
HETEROPENTÁMERO



HOMOPENTÁMERO

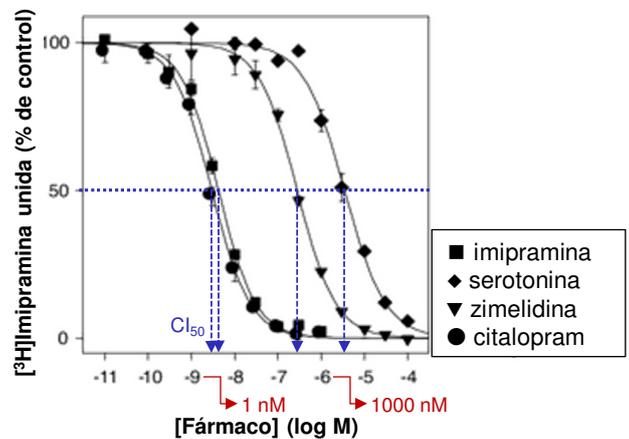


El carácter agonista parcial de Var sobre algunos subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos cerebrales se traduce en una estimulación más débil que la producida por la nicotina inhalada con el humo del tabaco. Los resultados experimentales mostrados en las gráficas ponen de manifiesto eficacias diferentes de Var sobre los distintos subtipos estudiados, así como una mayor afinidad por los receptores $\alpha 4\beta 2$, los cuales regulan la liberación de dopamina en ciertas áreas cerebrales, como el cuerpo estriado. Esta acción selectiva serviría para atenuar las propiedades reforzadoras de la nicotina y disminuir tanto el deseo de fumar como el síndrome de abstinencia producido al dejar de fumar.



(Mol. Pharmacol. 70(3):801-805, 2006)

ENUNCIADO. Incubamos una preparación de membranas de células humanas embrionarias de riñón (HEK293) que expresan el gen humano *SLC6A4* con 2 nM de [³H]imipramina durante 60' a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, añadimos a cuatro series de alícuotas de esta preparación concentraciones crecientes de imipramina, serotonina, zimelidina y citalopram, y dejamos incubar otros 60'. Cuando, tras filtrar, determinamos la radioactividad residual en esas membranas celulares y representamos los datos, obtenemos las curvas mostradas en la figura adjunta (los valores están corregidos para considerar solo la fijación específica).



Responda a las siguientes preguntas (utilizando solo el espacio asignado en esta página):

- ¿Qué significa [³H] delante del nombre del fármaco? (1 punto):
Significa que la molécula es un radioligando porque uno o más átomos de hidrógeno han sido sustituidos por tritio, el isótopo radiactivo del hidrógeno.
- ¿Por qué se utilizan este mismo fármaco y la serotonina en el propio experimento? (2 puntos):
Se utilizan el mismo fármaco "frío" (sin etiquetar) y el ligando endógeno como controles internos para confirmar el desplazamiento.
- ¿Cómo se denominan (a) el instrumento que nos permite medir la radioactividad y (b) el tipo de experimento? (1 punto):
(a) Contador de centelleo líquido / (b) Experimento de desplazamiento de radioligando.
- ¿Por qué es necesario utilizar esta técnica y no otras basadas en espectroscopía UV/visible o fluorescencia, por ejemplo? (1 punto):
Porque la sensibilidad es mucho mayor, de modo que se pueden detectar diferencias de concentración muy bajas, del orden de nM.
- ¿Qué propiedad de estos cuatro ligandos nos permite caracterizar este experimento? (1 punto):
La afinidad de cada ligando por la proteína codificada en el gen *SLC6A4*.
- A partir de la gráfica, cuantifique –de forma aproximada– esta propiedad para la serotonina y cada uno de los fármacos estudiados (en unidades de nM) y explique la relación existente entre el parámetro calculado anteriormente y la constante de disociación (K_d) (2 puntos):
Cuantificamos la concentración de ligando que desplaza el 50% del radioligando unido = CI_{50} :
- serotonina: $CI_{50} \approx 4300$ nM - imipramina: $CI_{50} \approx 2$ nM - zimelidina: $CI_{50} \approx 360$ nM - citalopram: $CI_{50} \approx 4$ nM
La CI_{50} nos da una medida de la afinidad y es directamente proporcional a la K_d , la cual se puede calcular haciendo uso de la ecuación de Cheng-Prusoff (conocida la concentración de radioligando utilizada y su K_d). Cuanto menor es la CI_{50} o la K_d , mayor es la afinidad.
- ¿Qué proteína codifica el gen humano *SLC6A4* y qué relevancia tienen los datos obtenidos desde un punto de vista terapéutico? (2 puntos) [puede continuar en el reverso]: Este gen codifica el transportador de serotonina (SERT) responsable de la recaptación de este neurotransmisor desde la sinapsis hacia la neurona que lo liberó. *SLC6A4* es un miembro de la superfamilia de transportadores de solutos ("SoLute Carriers") que se considera la principal diana de los antidepresivos tricíclicos (por ej., imipramina y citalopram), los cuales inhiben la recaptación. Al presentar estos fármacos afinidades por SERT mucho mayores que la propia serotonina, se pueden alcanzar concentraciones eficaces con dosis muy bajas (mg).