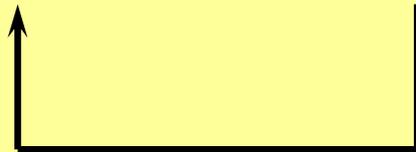


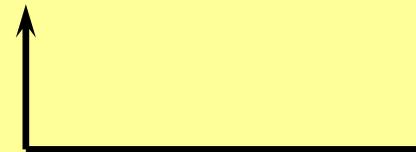
Estudio de receptores

Jenny Fiedler

Lab. Neuroplasticidad y
neurogenética



Farmacocinetica

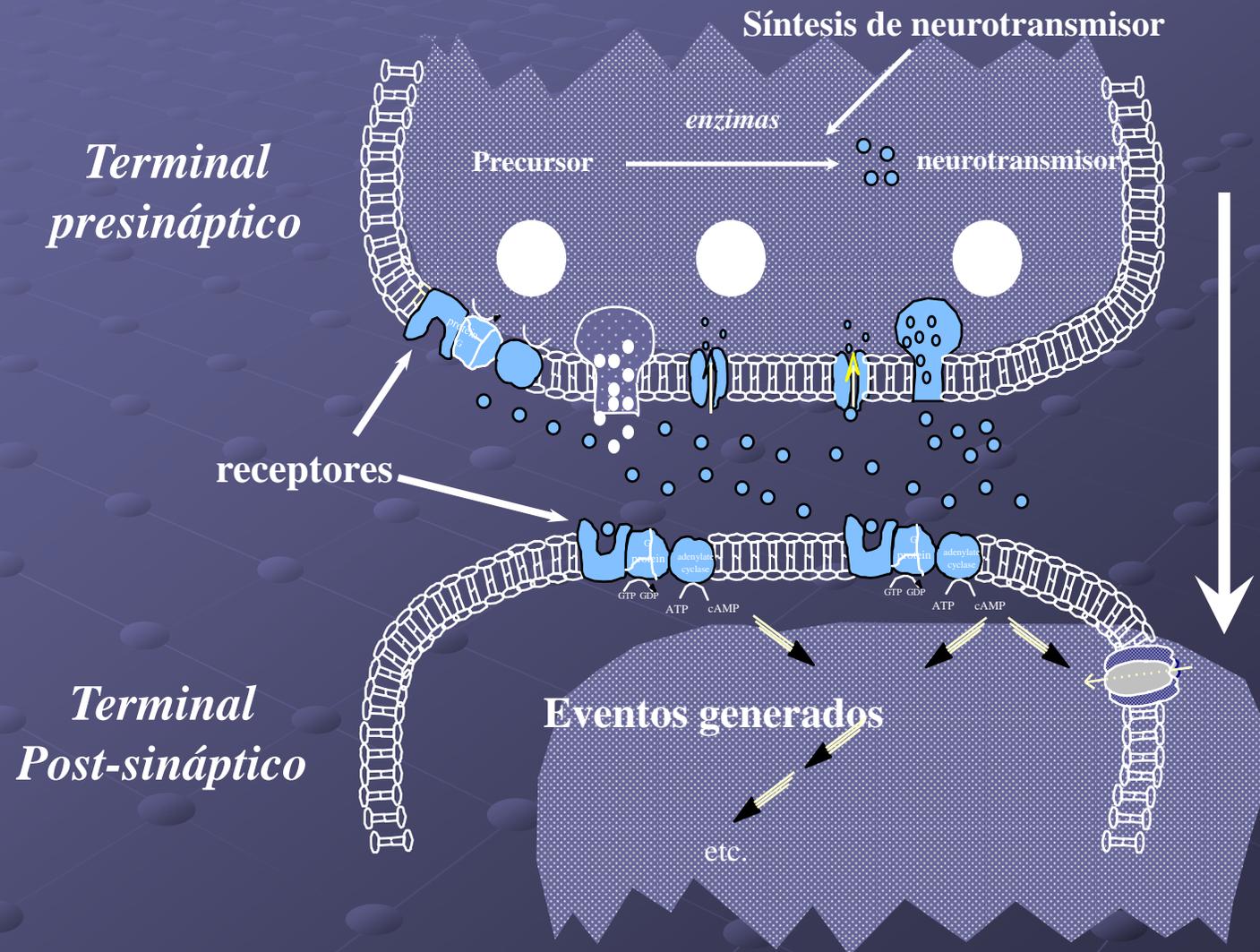


Farmacodinamia

Cómo los fármacos pueden antagonizar, bloquear o inhibir proteínas endógenas

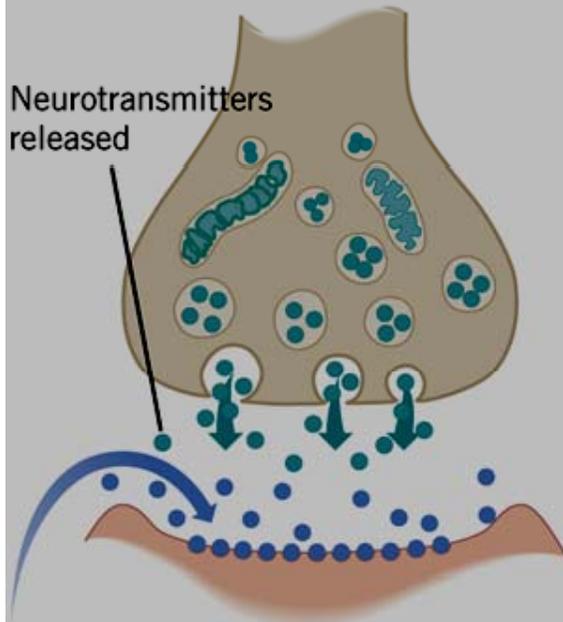
- **Antagonistas de receptores superficie celular**
- **Antagonistas de Receptores nucleares**
- **Inhibidores enzimáticos**
- **Bloqueadores de canales iónicos**
- **Inhibidores del transporte de moléculas**
- **Inhibidores de Proteínas asociadas a la transducción de señales**

Sitios de acción de drogas en sistema nervioso



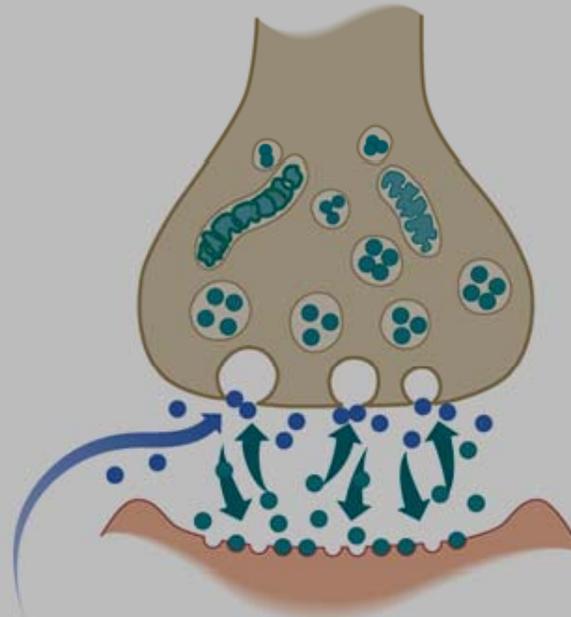
Como aumentar la acción de los NT

(a) Decreases neural transmission by "locking up" receptor sites



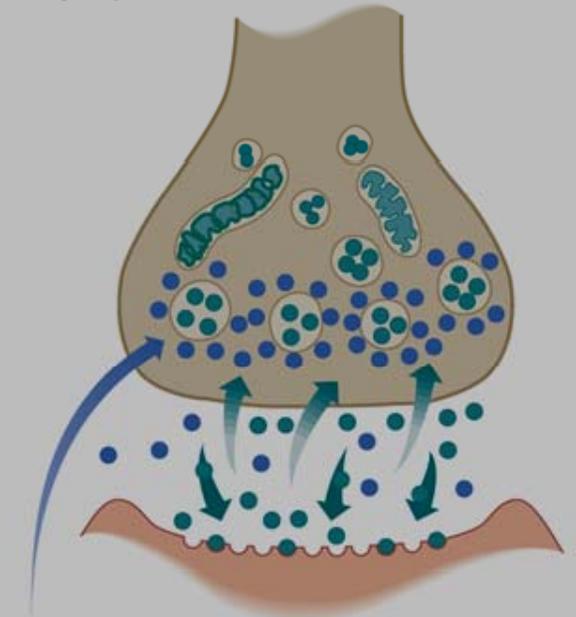
Drug binds with receptors to prevent them from being activated by the neurotransmitters in the synapse.

(b) Increases neural transmission by blocking reuptake



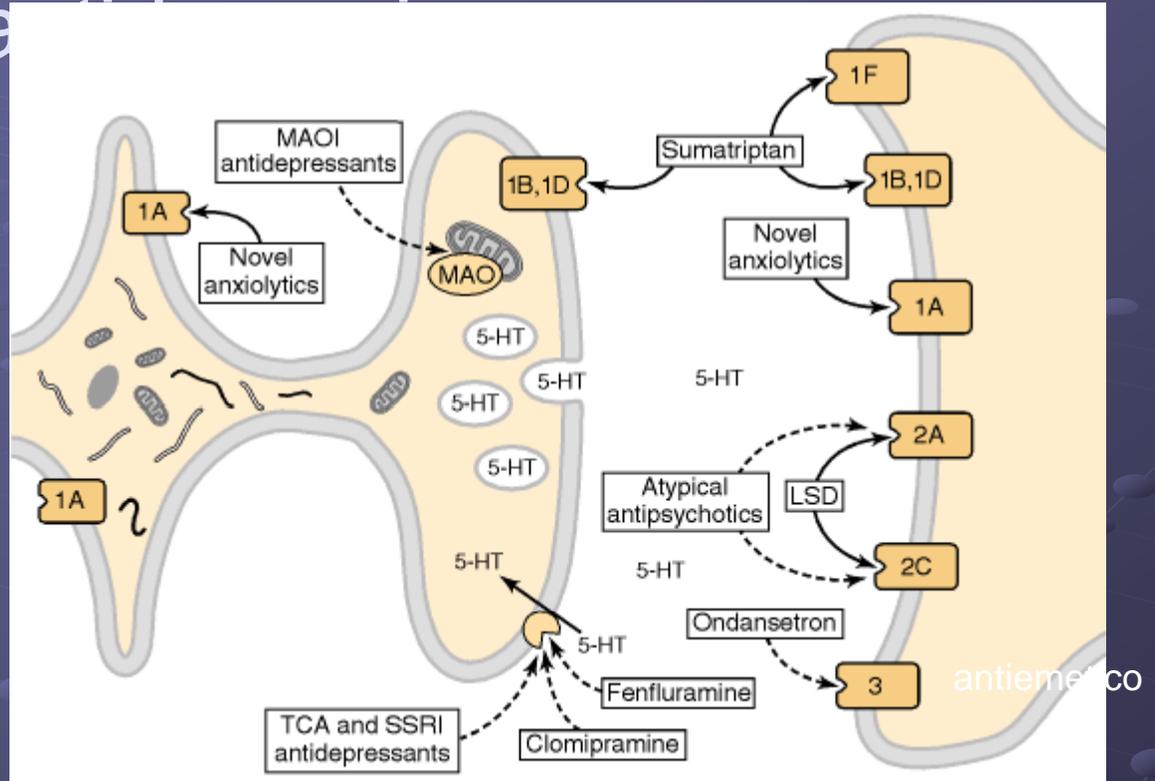
Drug blocks neurotransmitters from being taken back into the presynaptic membrane, leaving the neurotransmitters in the synapse longer.

(c) Increases neural transmission by blocking breakdown of neurotransmitters in synaptic vesicles



Drug prevents the neurotransmitter returning from the synapse from being broken down for storage, which keeps it available at the synapse.

Mecanismo de acción de los fármacos



- Antidepresivos tricíclicos: actúan bloqueando la captación de 5HT o NA
- Inhibidores de la Mono-aminooxidasa (MAO degrada NT); así permite que los NT actúen por períodos más prolongados.
- Inhibidores selectivos de serotonina: Prozac

Característica de los receptores

- **Estereoselectividad** – los receptores deberían reconocer a uno de los isómeros ópticos (+ o -, d o l, o S o R).
- **Especificidad de agonistas** – compuestos estructuralmente relacionados deberían unirse bien al receptor, mientras que moléculas no relacionadas lo deberían hacer pobremente.
- **Especificidad de tejido** – la unión debería ocurrir en tejidos sensibles al ligando. La unión debería ocurrir a concentraciones fisiológicas relevantes.

Si un fármaco no satisface estas condiciones indica la presencia de unión no específica a proteínas o fosfolípidos presentes en las membranas.

Teoria de la ocupación



$$[D] \cdot [R] \cdot K_1 = [DR] \cdot K_2$$

$$K_2 / K_1 = K_d = [D] \cdot [R] / [DR]$$

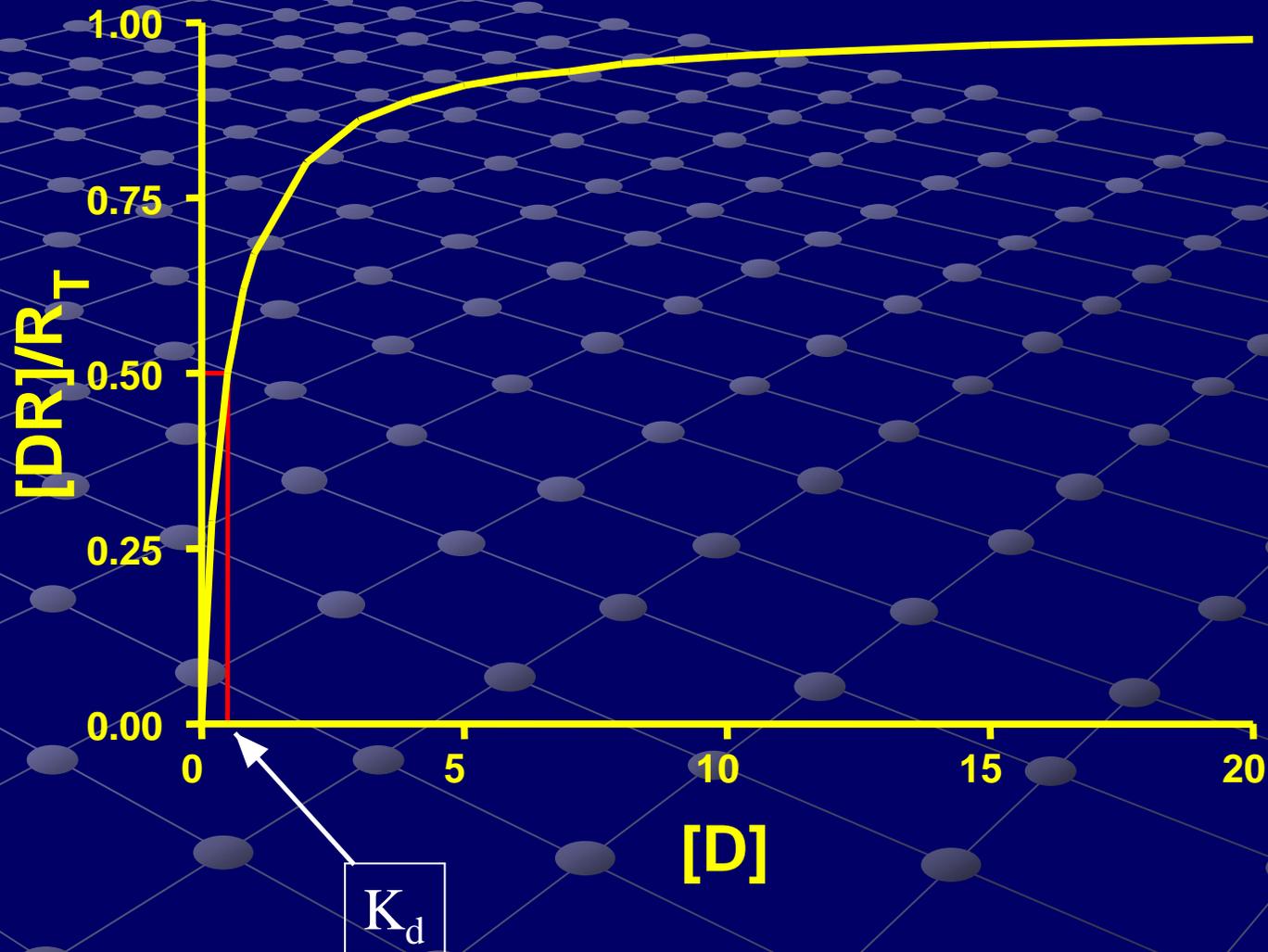
$$R_T = \# \text{ total de receptores, } R_T = [R] + [DR]$$

Reemplazo de $[R]$ por $(R_T - [DR])$

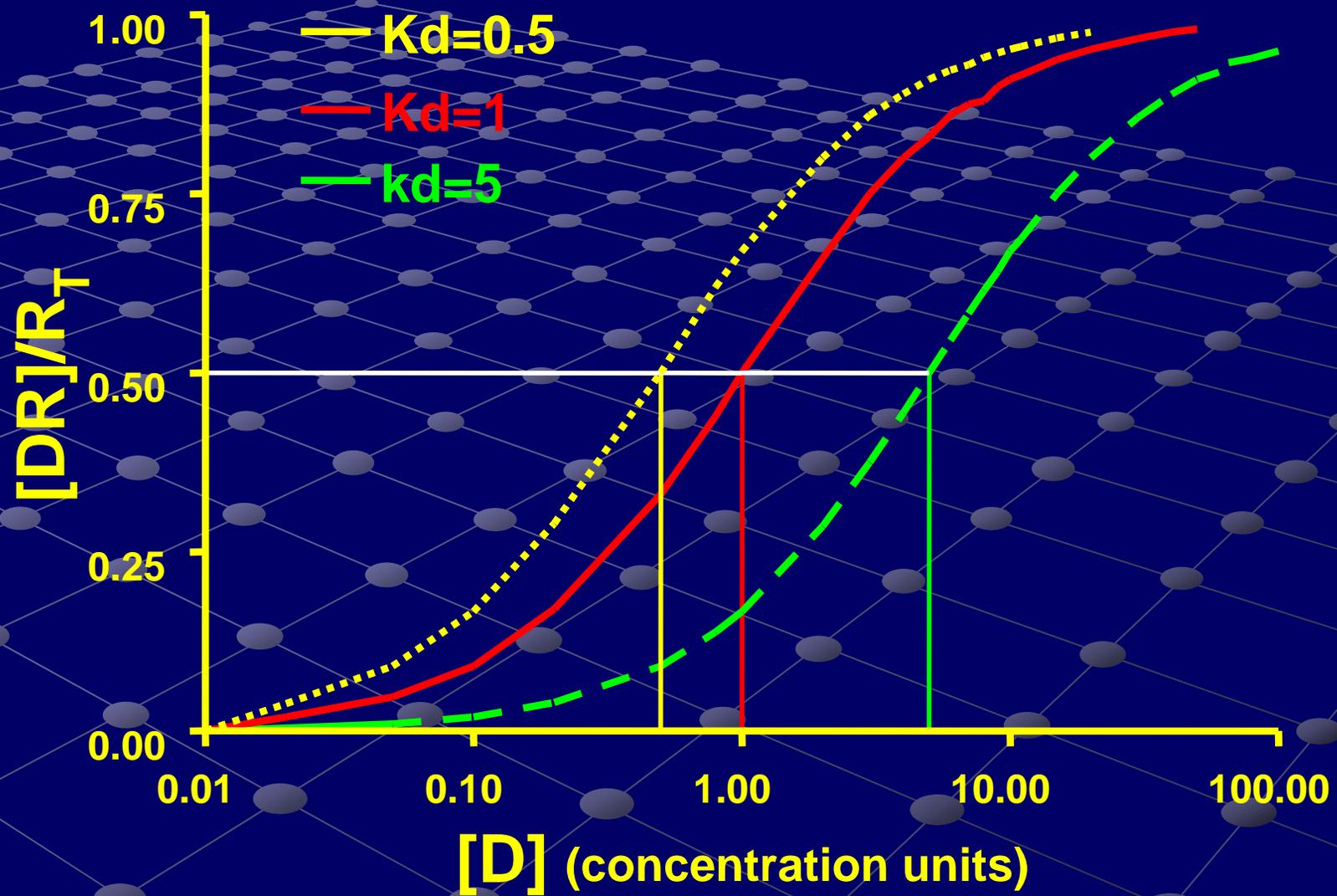
$$\frac{[DR]}{R_T} = \frac{[D]}{K_d + [D]} = \frac{\text{efecto}}{\text{Max. efect}}$$

$$\frac{\text{effect}}{\text{Max. effect}} = \frac{[\text{DR}]}{R_T} = \frac{[\text{D}]}{K_d + [\text{D}]}$$

$$[\text{D}] = K_d$$
$$\frac{[\text{DR}]}{R_T} = 0.5$$



Compuestos con diferentes afinidades



Antagonistas de acuerdo al efecto máximo

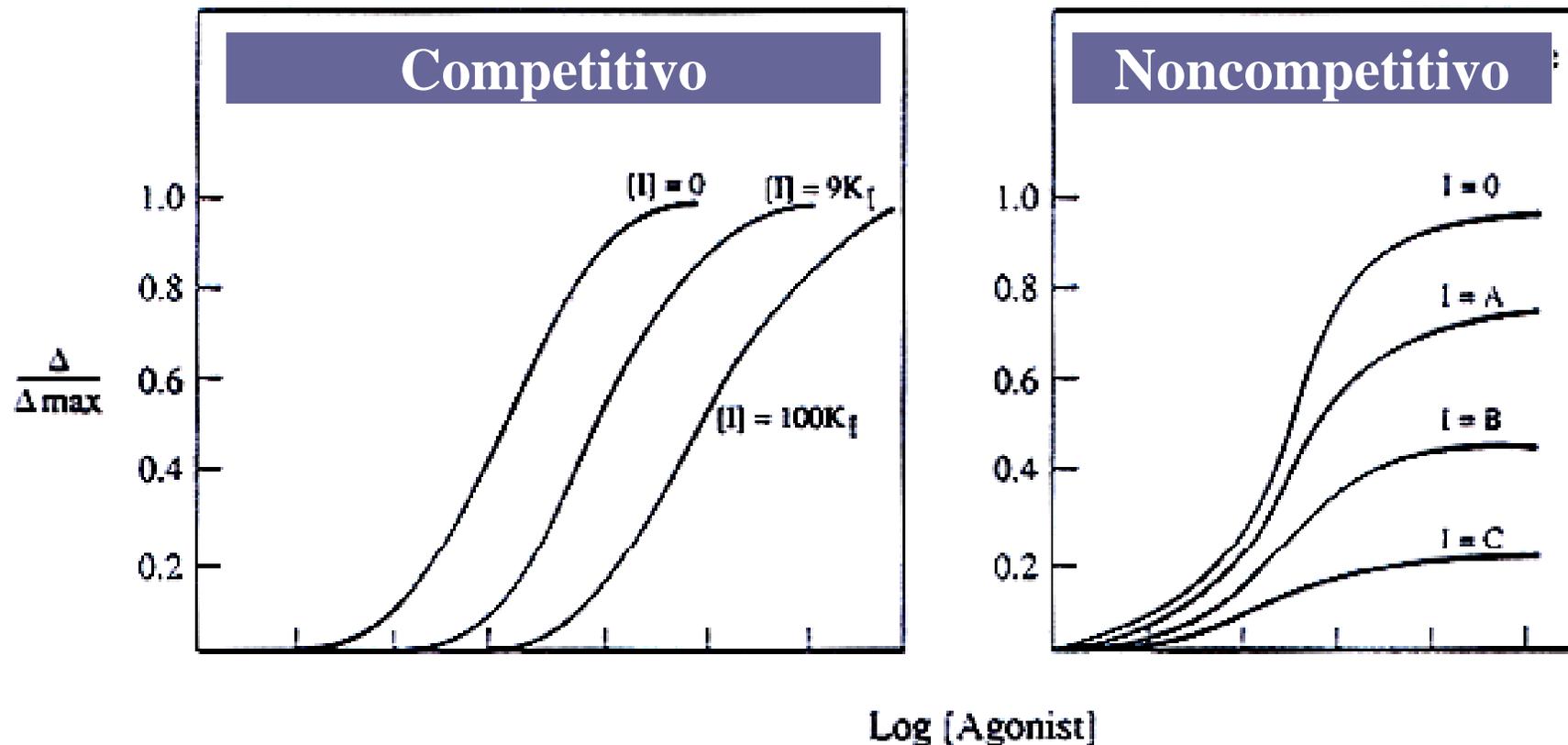


Fig. 1-35. Analysis of antagonism by semilogarithmic plots. The left panel shows the pattern for competitive antagonism of a response to an agonist produced by increasing concentration of competitive inhibitor I. A parallel rightward shift in the response curve without a change in maximal response occurs. The extent of rightward shift is a consequence of the ratio of [I] to K_I , the equilibrium dissociation constant of the inhibitor. The right panel shows the pattern expected for non-competitive antagonism, in which the maximal response decreases, without a change in the concentration producing half maximal-response, as the inhibitor concentration increases. $A < B < C$.

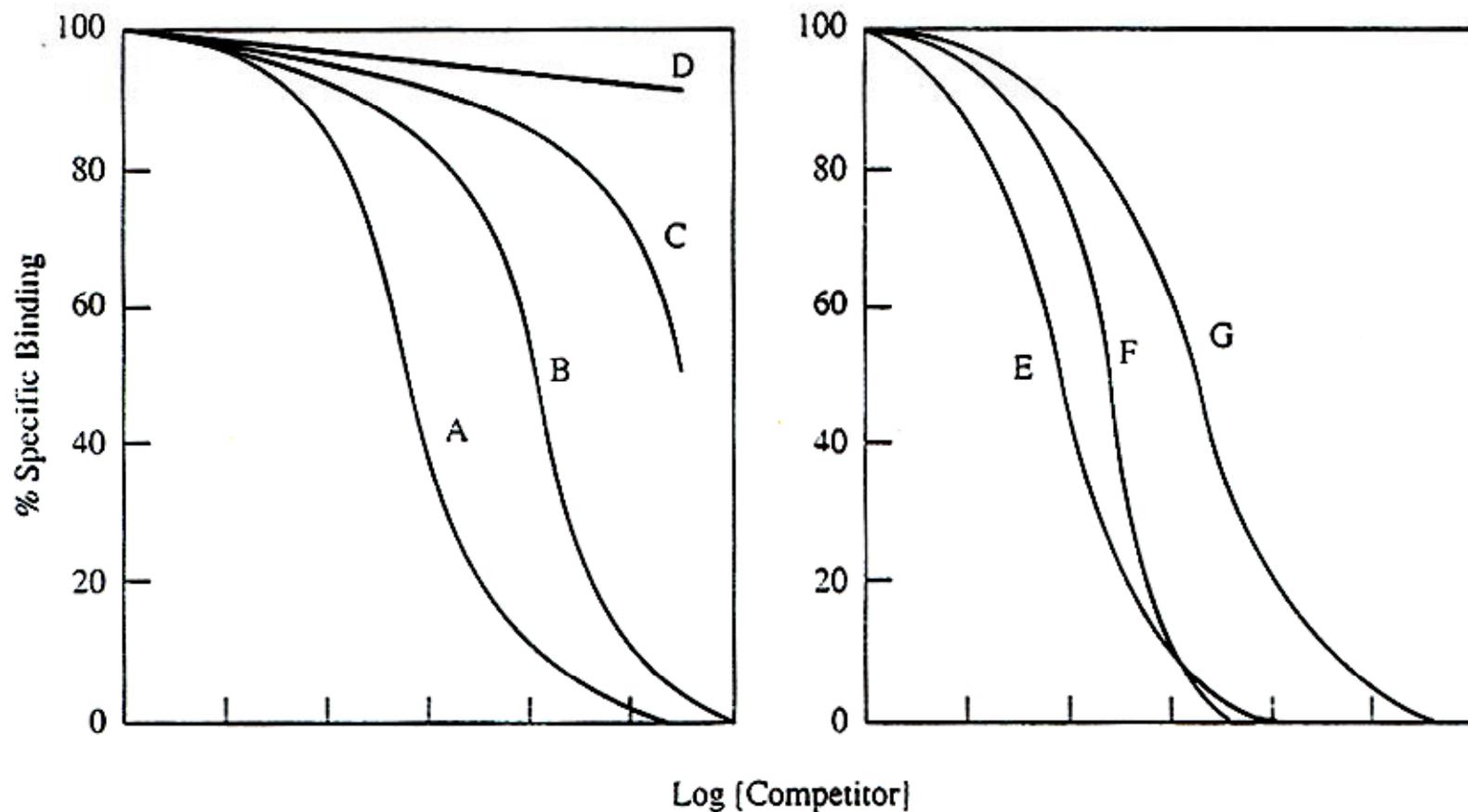
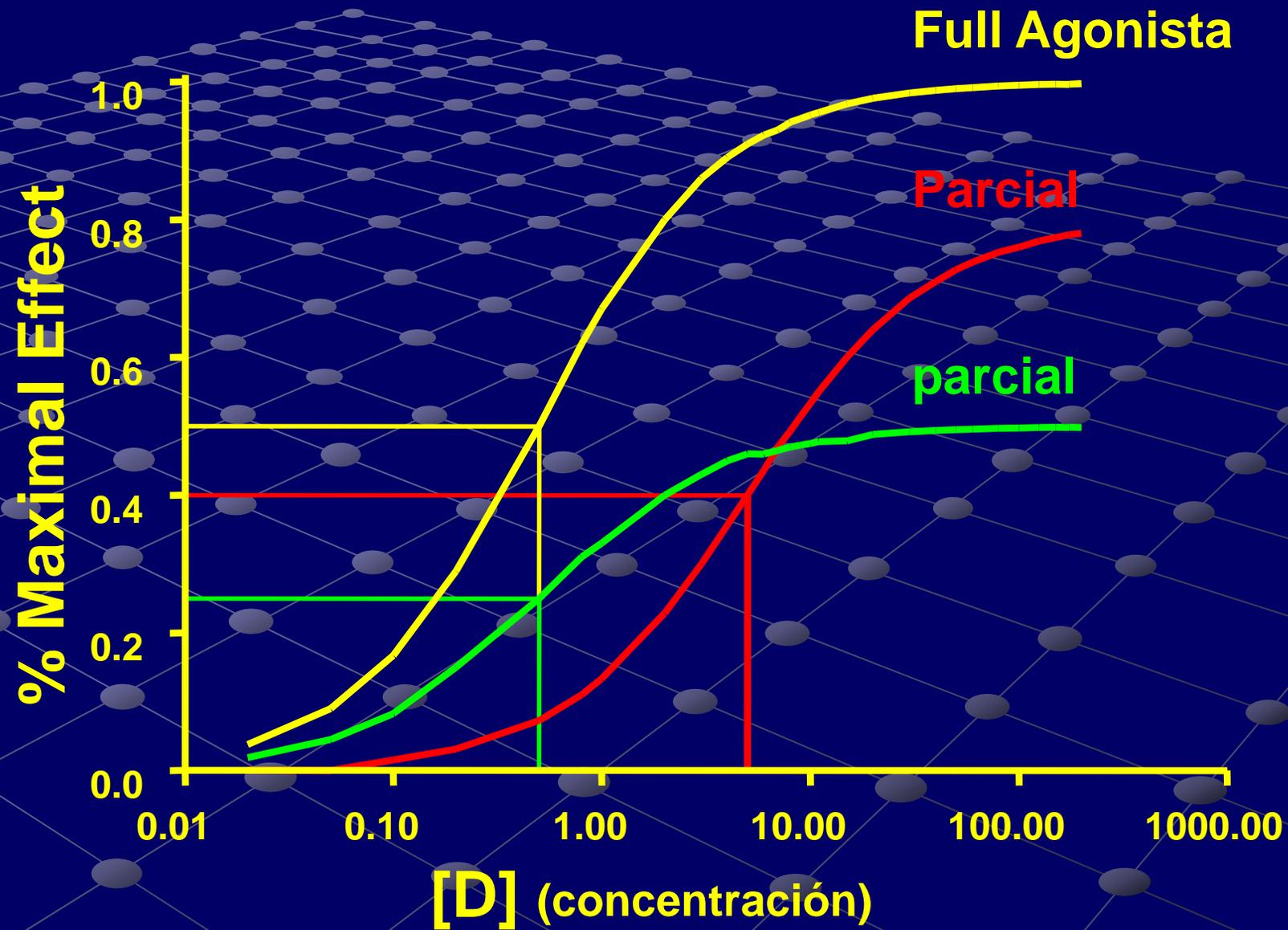


Fig. 1-32. Competitive binding experiments assessing ligand-receptor interaction. A radioligand has been incubated with tissue receptors in the absence and presence of varying concentrations of several compounds (A through G), which compete for the radioligand binding sites. In the left panel, the rank order of potency in competing for sites is $A > B > C \gg D$. In the right panel, Drug E competes in a manner compatible with interaction at a single class of sites, while drug F shows a steeper curve and competes over a narrower concentration and drug G shows a shallower curve and competes over a larger range of concentration.

Agonistas



Receptores de reserva

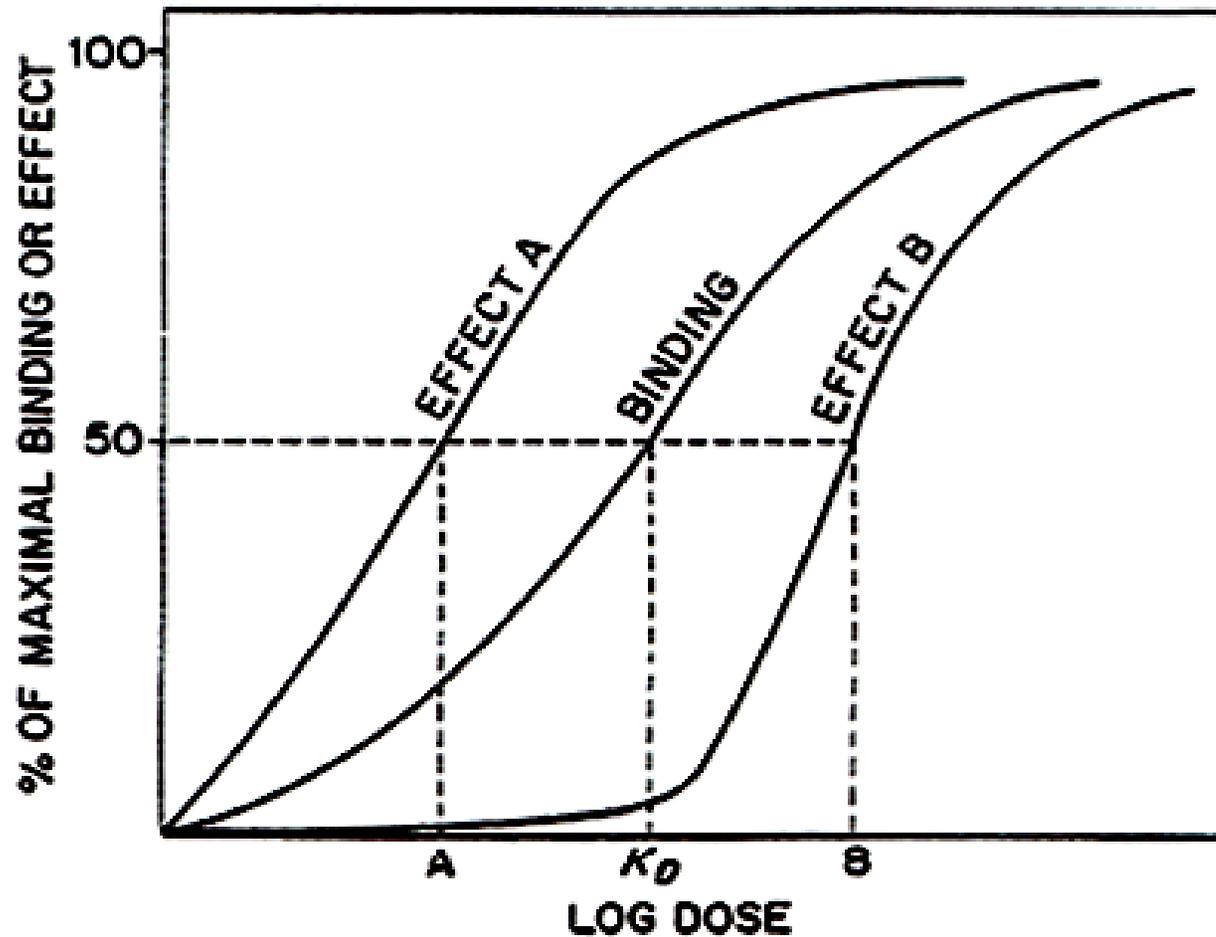


Figure 2-4. *Anomalous relationships between receptor occupation and response to a drug.*

Ensayo de unión a receptores

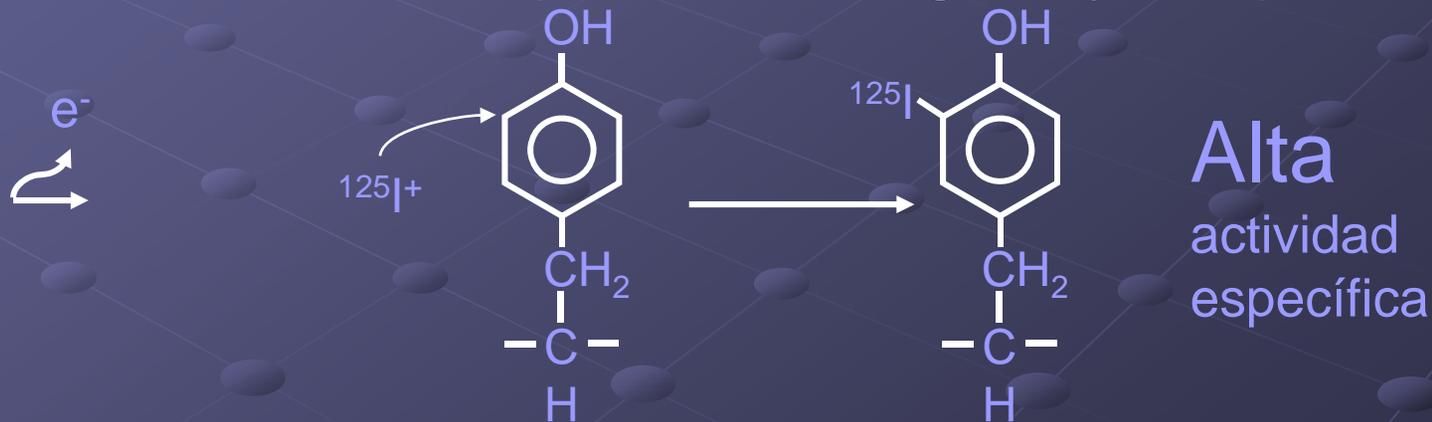
- Receptor
- Radioligando
- Condición de equilibrio
- Técnica de separación del complejo L-R del ligando libre apropiada
- Descartar la unión no específica
- Calculos
- Validez

Marcaje del ligando

Biosíntesis con ^3H o ^{14}C

^{125}I usado cuando el ligando es un péptido (emisor γ) (Involucra a $^{125}\text{I}^+$)

Problemas: Iodinación puede dañar el ligando y/o las proteínas



Receptor

Células enteras

Facil de obtener
Receptores de
superficie
Células vivas y
muertas?

Fracciones celulares

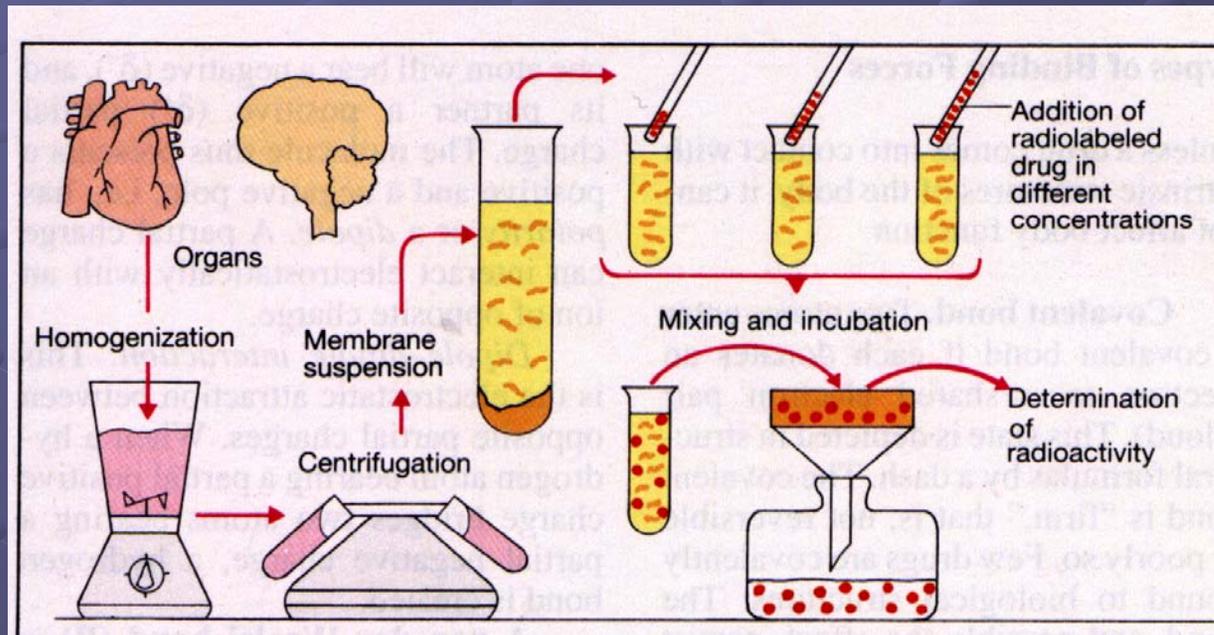
Preparación de
membranas

Determinación de la
pureza

Pérdida de
componentes solubles
que modulan la unión

Tejido apropiado

Método rápido separación complejo ligando-Receptor



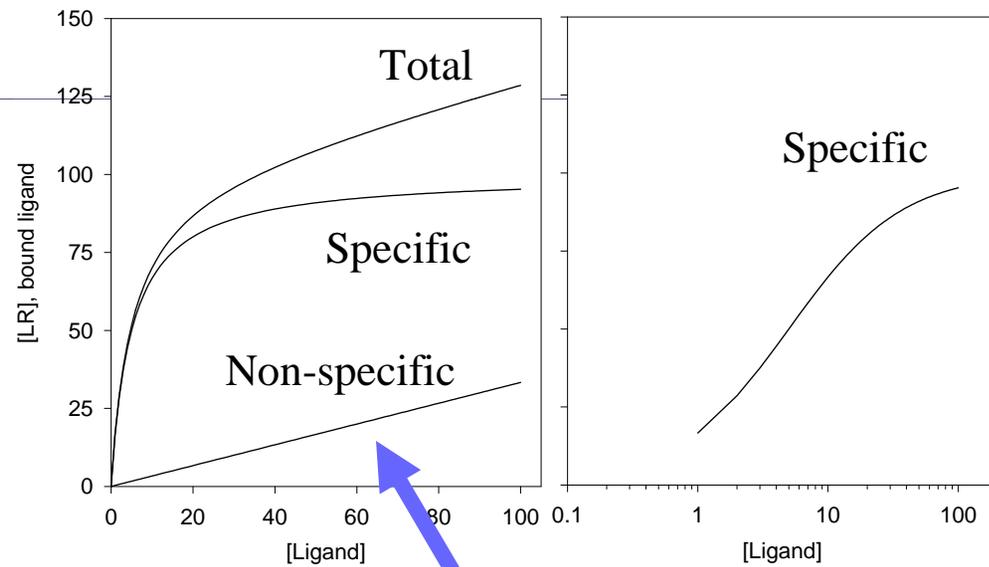
Unión no específica

- Además de unirse el ligando a sus receptores con interés biológico, se une a **sitios aceptores**.
- Se necesita medir tanto la unión total como la no específica para calcular la unión solo a la población de receptores.
- Para determinar la unión no específica del radioligando, esta se hace en presencia de una concentración de un compuesto no marcado que se une esencialmente a todos los receptores.

Unión no Específica

- ¿Qué droga no marcada se debe usar??
 - Utilizar un fármaco no marcado que se une al receptor.
- ¿Que concentración del fármaco no marcado se debe usar?
 - Cercana a 100 veces la K_D que presenta por el receptor.

Unión no específica



Linear y no-saturable

Consideraciones Prácticas

- Estudiar la unión del ligando a una concentración de receptor determinada empíricamente
- La concentración de ligando marcado está en exceso con respecto al número total de receptores.
- Se asume que la [radioligando] libre es idéntica a la cantidad agregada.

Consideraciones Prácticas

[L*]	Bound (total)	Bound (NS)	Specific
0.1	$X_{0.1}$	$Y_{0.1}$	$X_{0.1}-Y_{0.1}$
0.3	$X_{0.3}$	$Y_{0.3}$	$X_{0.3}-Y_{0.3}$
1	X_1	Y_1	X_1-Y_1
3	X_3	Y_3	X_3-Y_3
10	X_{10}	Y_{10}	$X_{10}-Y_{10}$
100	X_{100}	Y_{100}	$X_{100}-Y_{100}$

Criterios esperados para la unión del ligando L a receptores fisiológicamente relevantes.

- La unión debe ser saturable
- La especificidad de agentes que compiten con el L por la unión al receptor deberían estar relacionados con la especificidad del efecto fisiológico.
- La cinética de unión y la unión de la droga al receptor debe ser consistente con el efecto biológico producido por L

Métodos Gráficos

1. Ajuste a una curva para determinar B_{\max}
(LR_{\max}) y K_D

$$\text{Unión específica } [LR] = \frac{[LR]_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

- Esta ecuación describe una hipérbola rectangular o isoterma
- $LR_{\max} = B_{\max} = R_{\text{total}}$

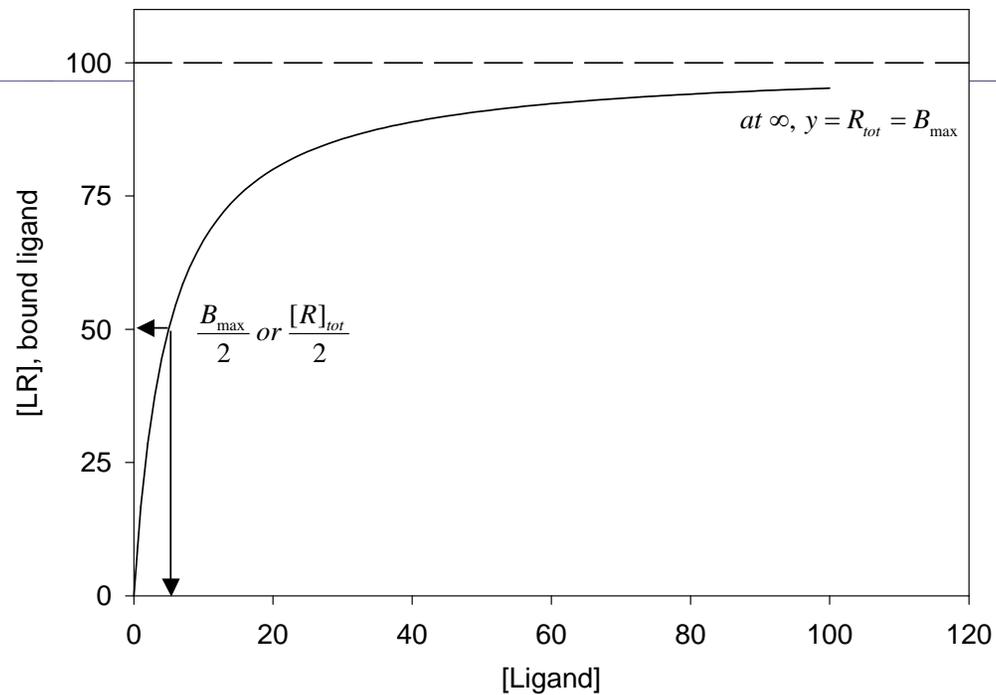
● La unión de la droga está dada:

- Número de receptores
- La concentración del ligando agregado
- La afinidad de la droga por su receptor

$$\text{Bound} = \frac{B_{\max} \times [\text{Radioligand}]}{K_D + [\text{Radioligand}]} \quad V_o = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Ajuste de Curvas para determinar B_{\max} (LR_{\max}) y K_D

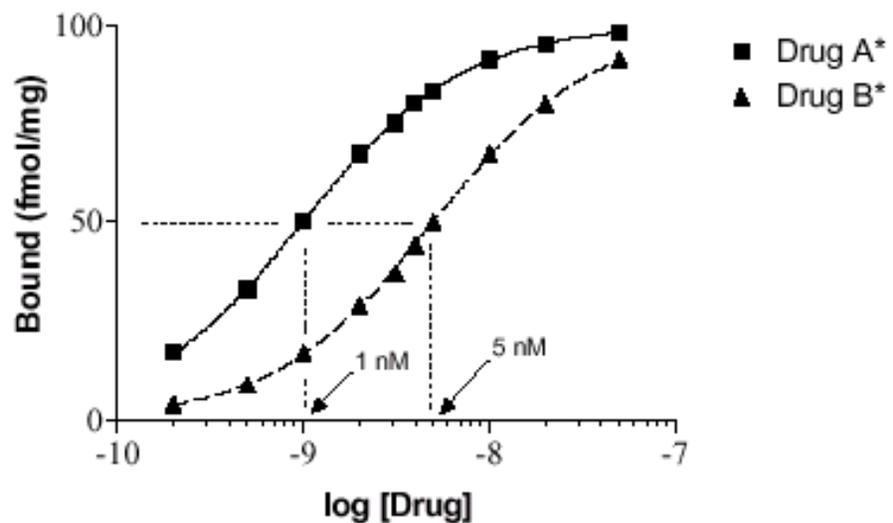
$$[LR] = \frac{[L][R]_{tot}}{K_d + [L]}$$



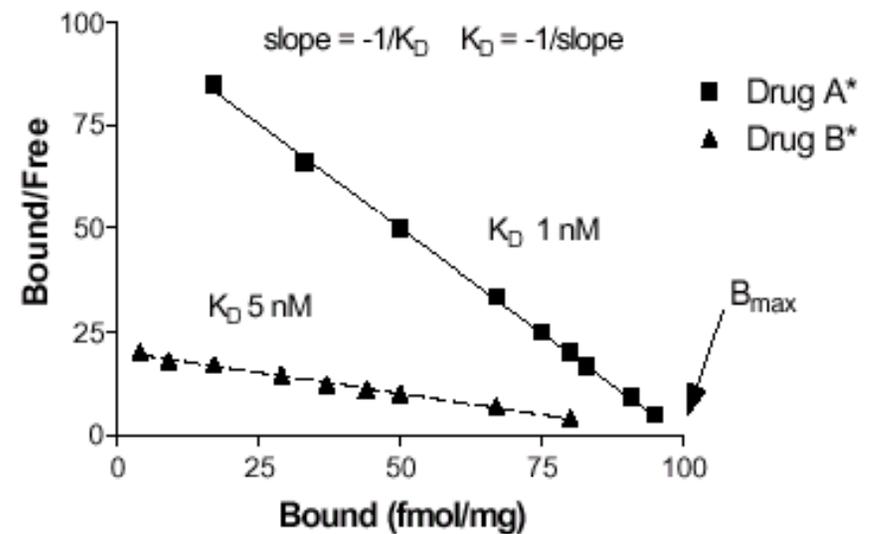
Transformación de Scatchard

- Y Bound/Free (radioligando unido/libre)
- X Bound (pmol/mg proteína).

Saturation Binding Curve
(log scale)

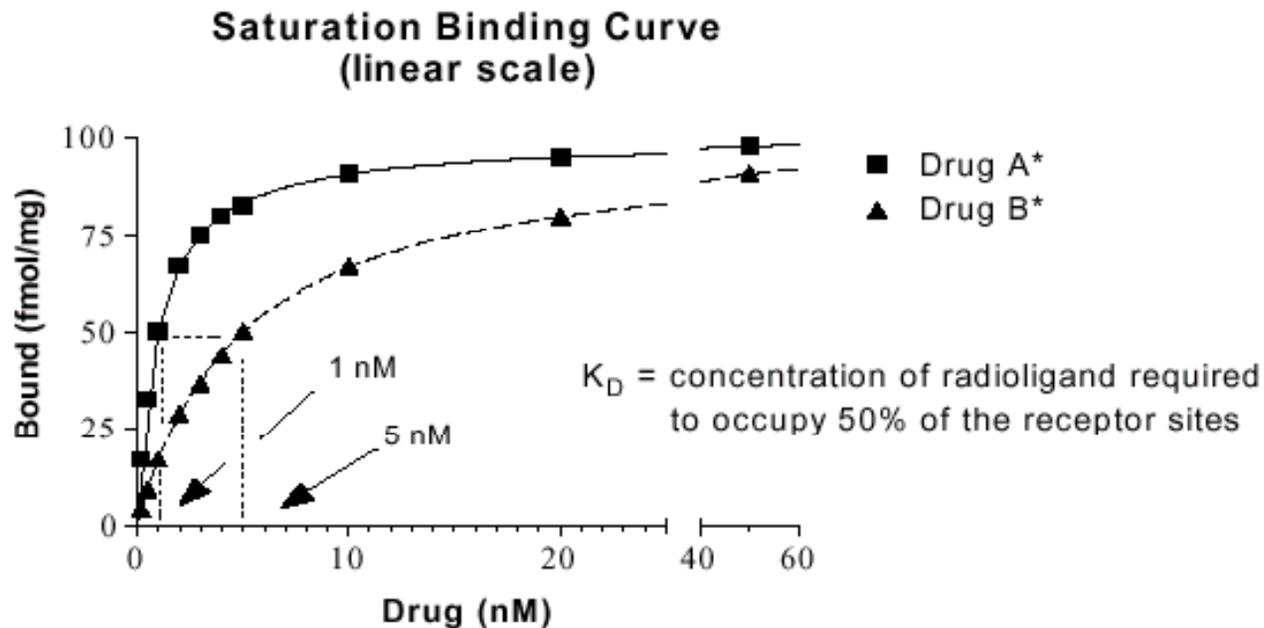


Scatchard Plot

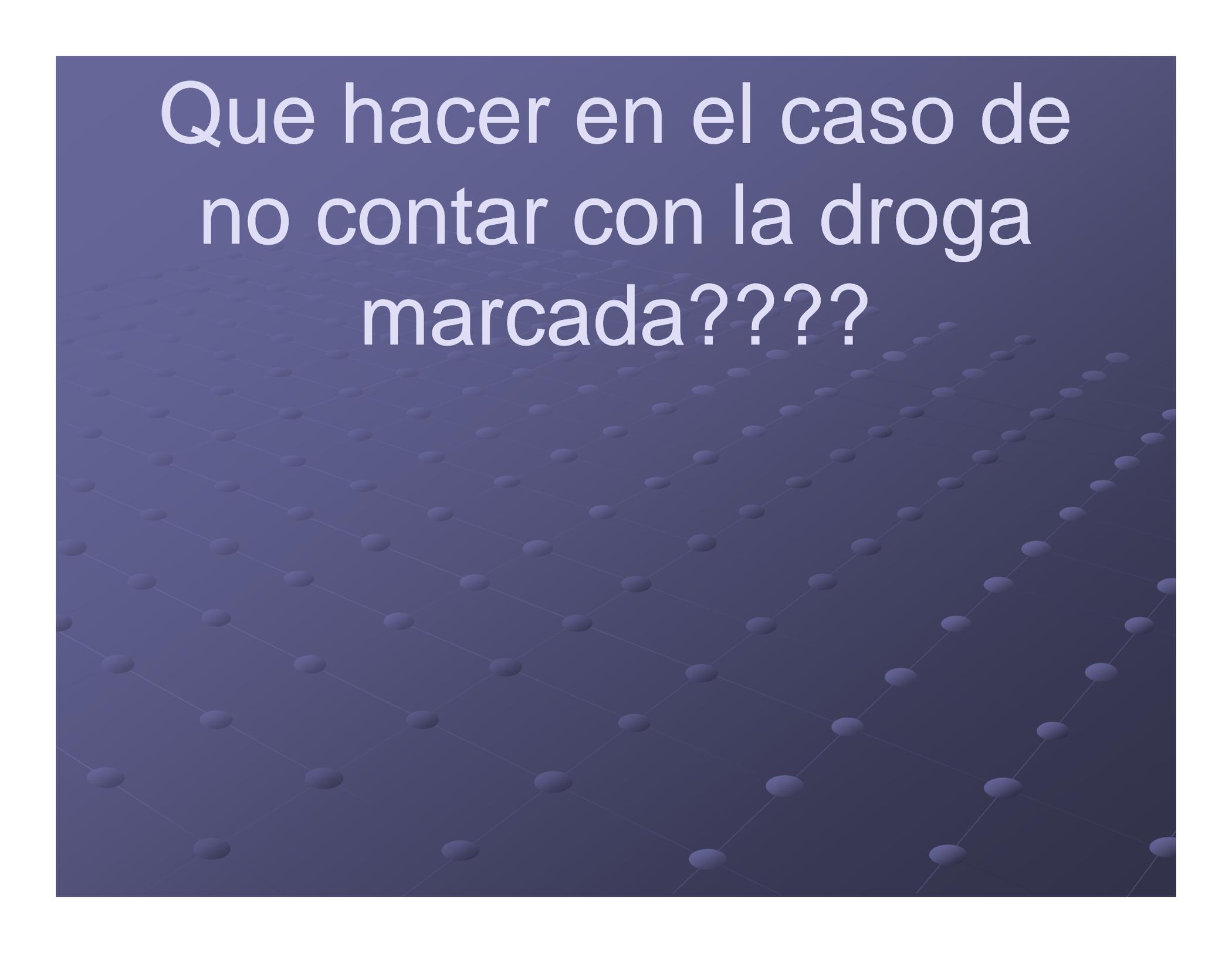


Estudios en el número de receptores

- Se puede estimar el número de receptores presentes en una preparación Ligando está marcado isotópicamente (^{125}I , ^{35}S or ^3H).
 - La selección de un ligando apropiado dependerá: Agonista vs. antagonista
 - Mayor afinidad para los antagonistas
 - Más resistentes a la incubación
- Saturación provee información del número de receptores (Densidad)

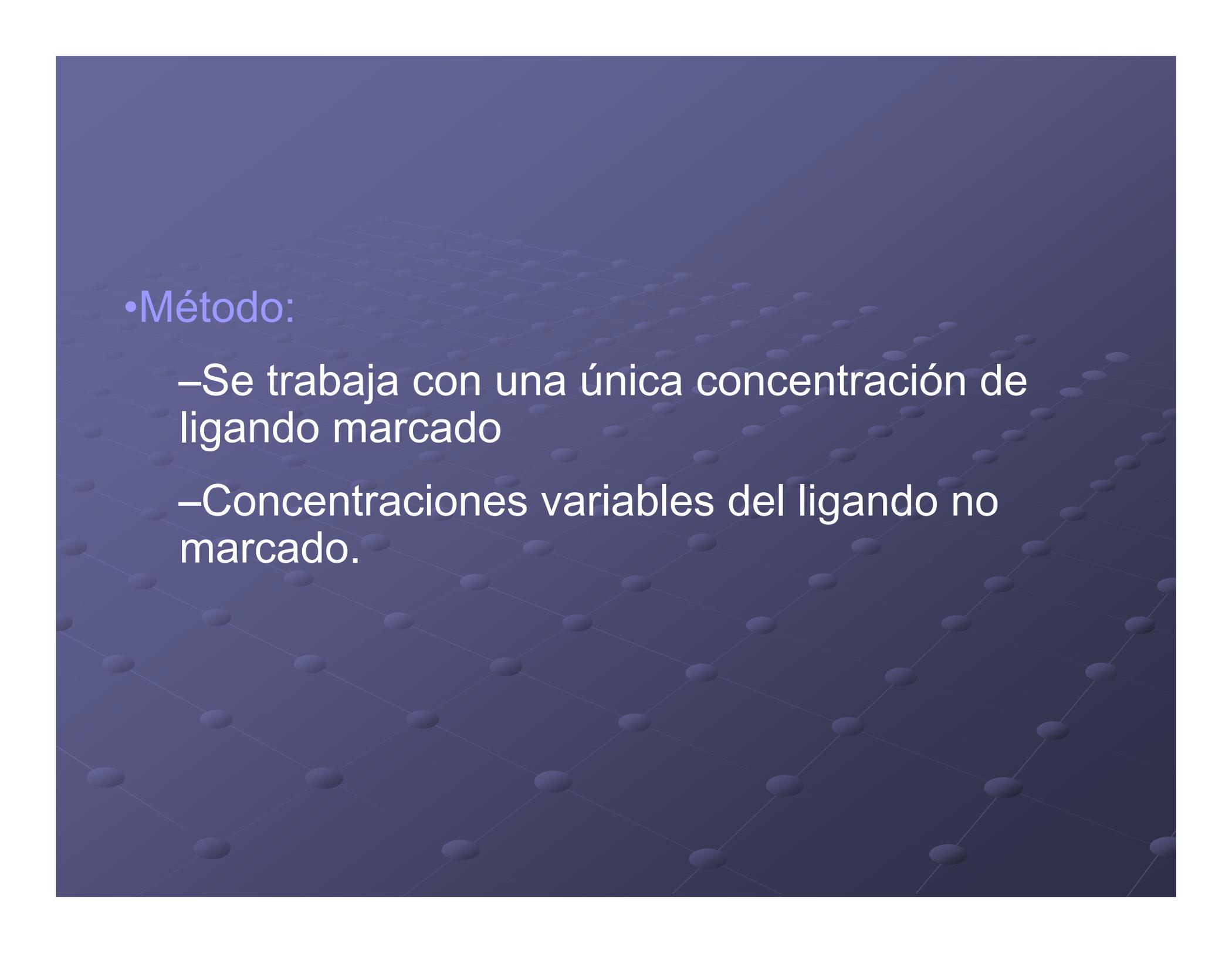


Que hacer en el caso de
no contar con la droga
marcada????



Ensayos de competencia

- Permite estimar la afinidad de un ligando no marcado por su receptor.
- Competitivo o no-competitivo.
- Adición de un compuesto no marcado (B) que también se va a unir a R lo que va a producir menor cantidad de receptor disponible para ligar al *L. Es decir B compite con *L para unirse al R, lo que se traduce en una reducción del *L-R.



- Método:

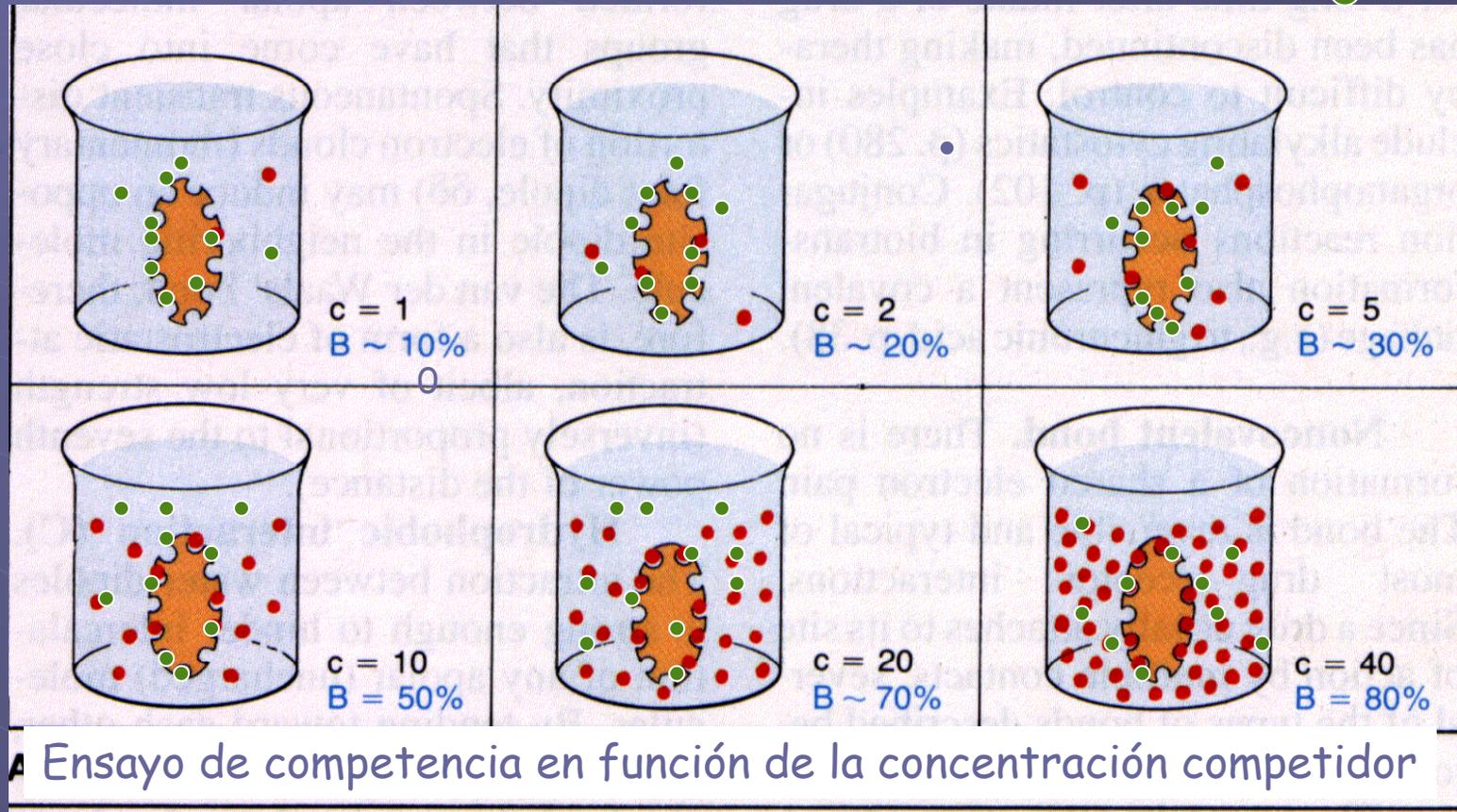
- Se trabaja con una única concentración de ligando marcado

- Concentraciones variables del ligando no marcado.

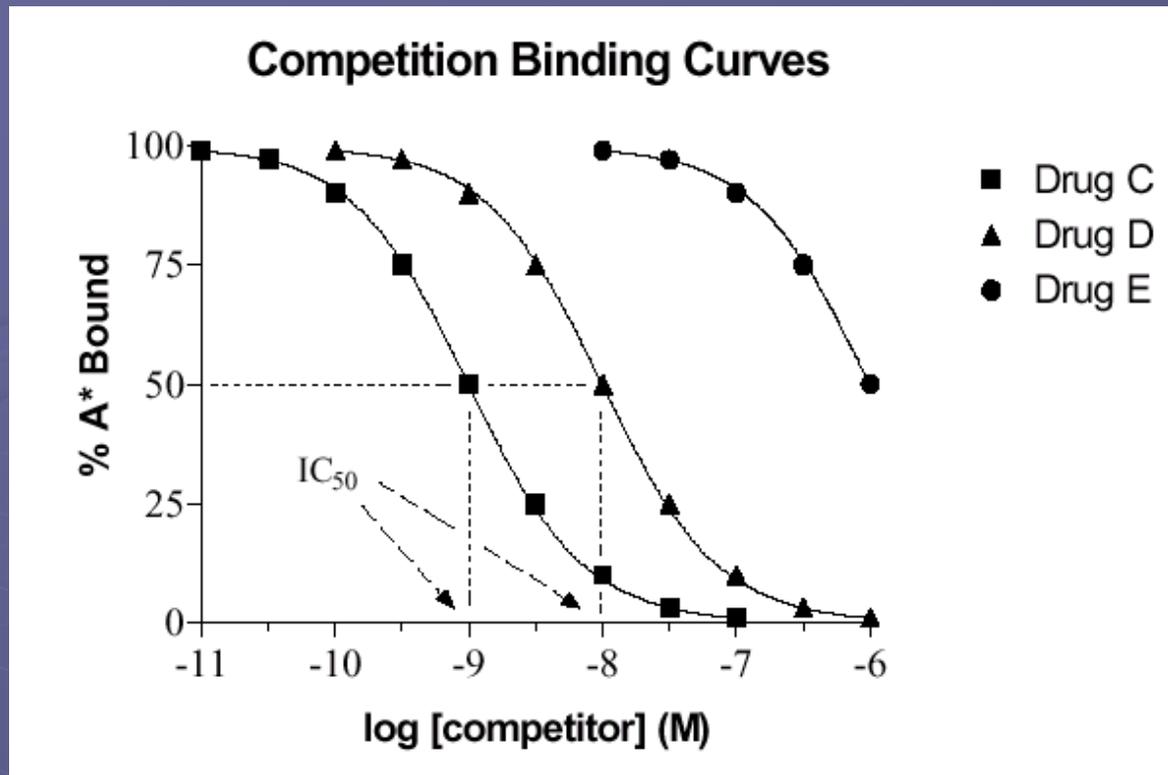
- La concentración del inhibidor que **COMPITE** con el 50% del ligando marcado se conoce como IC_{50} para la droga.
- IC_{50} no corresponde a la “ K_D ” del inhibidor
- K_i = constante de disociación del inhibidor al equilibrio
 - Es la concentración del inhibidor (competidor) que se une al 50% de los sitios receptores.
- K_i se puede determinar si se conoce la IC_{50} .
- Mediante la ecuación de Cheng y Prusoff.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligando]}{K_d}}$$

Ensayo de competencia



- Ligando marcado isotópicamente
- Competidor concentración variable



Example: Find K_i of morphine in a preparation with ^3H -diprenorphine.

$\text{IC}_{50} = 100 \text{ nM}$

$[\text{L}] = 3 \text{ nM}$

$K_D = 1 \text{ nM}$

$K_i = 25 \text{ nM}$

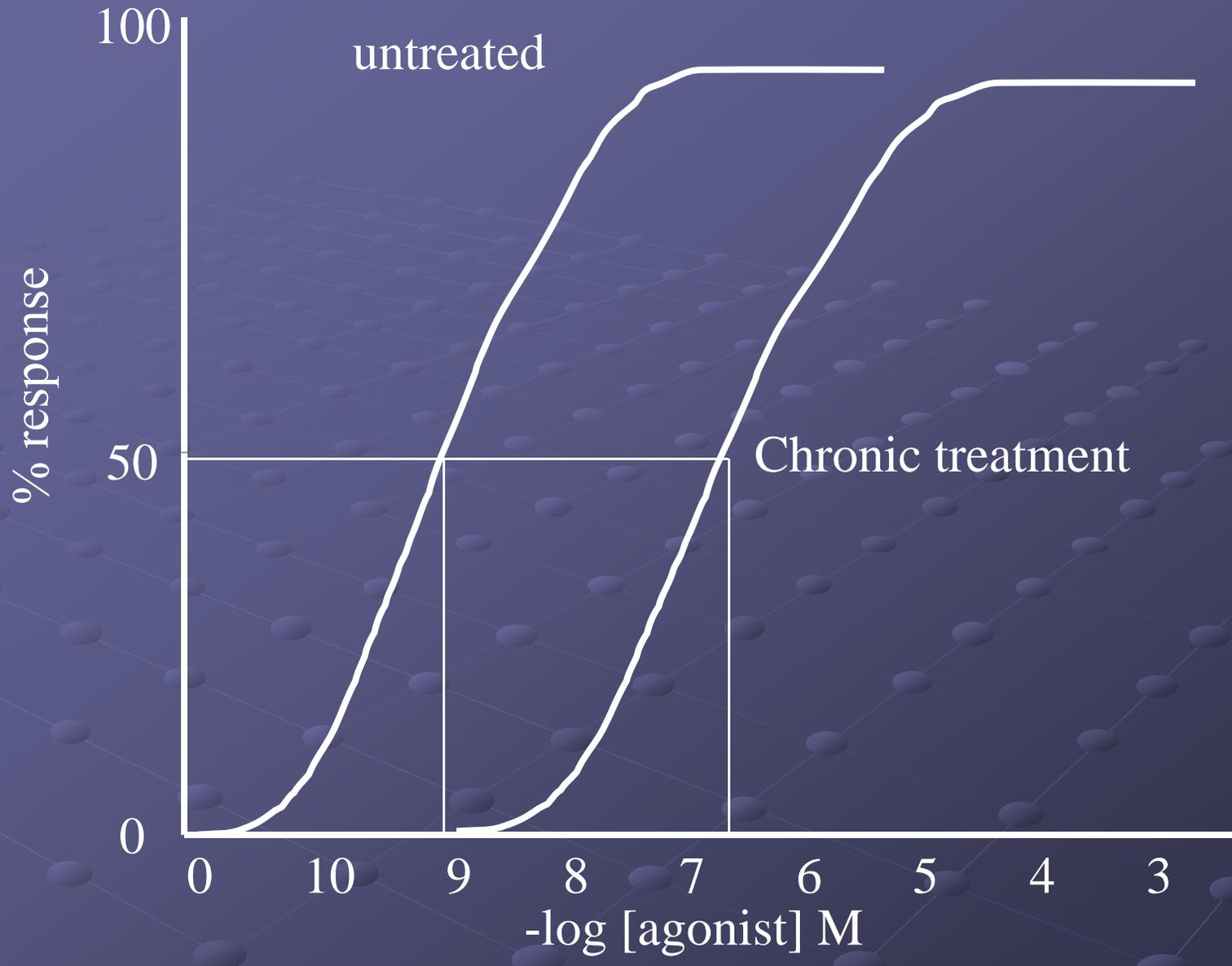
Desensibilización de receptores

- Pérdida de la afinidad por el agonista sin cambios en la población de receptores por una estimulación crónica.
 - β_2 -AR.
 - Activación de PKA/GRKs
 - fosforilación
 - β -arrestina
- Desacoplamiento del receptor a la proteína G
- Resulta en un desplazamiento de la curva de competencia hacia la derecha: ***desensibilización***.
- K_D de isoproterenol (1 \rightarrow 100 nM)
 - Reducción de la afinidad affinity
 - B_{max} no cambia).
- β -arrestina une a clathrin.
 - Complejo se internaliza formando un endosoma
 - Disminución transiente de receptores en la superficie.

Desensibilización del Receptor

B/F

Bound

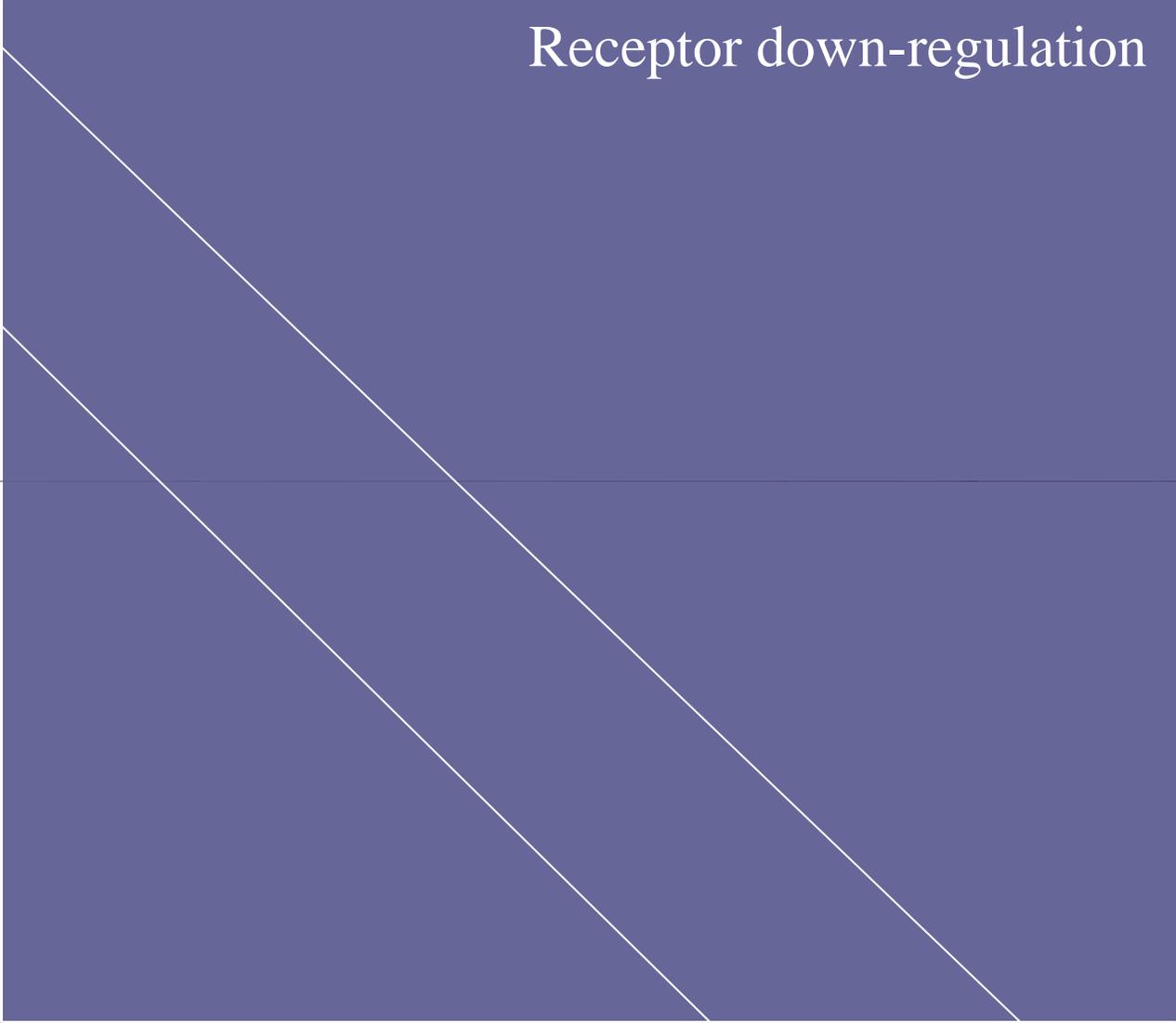


Regulación hacia abajo del receptor

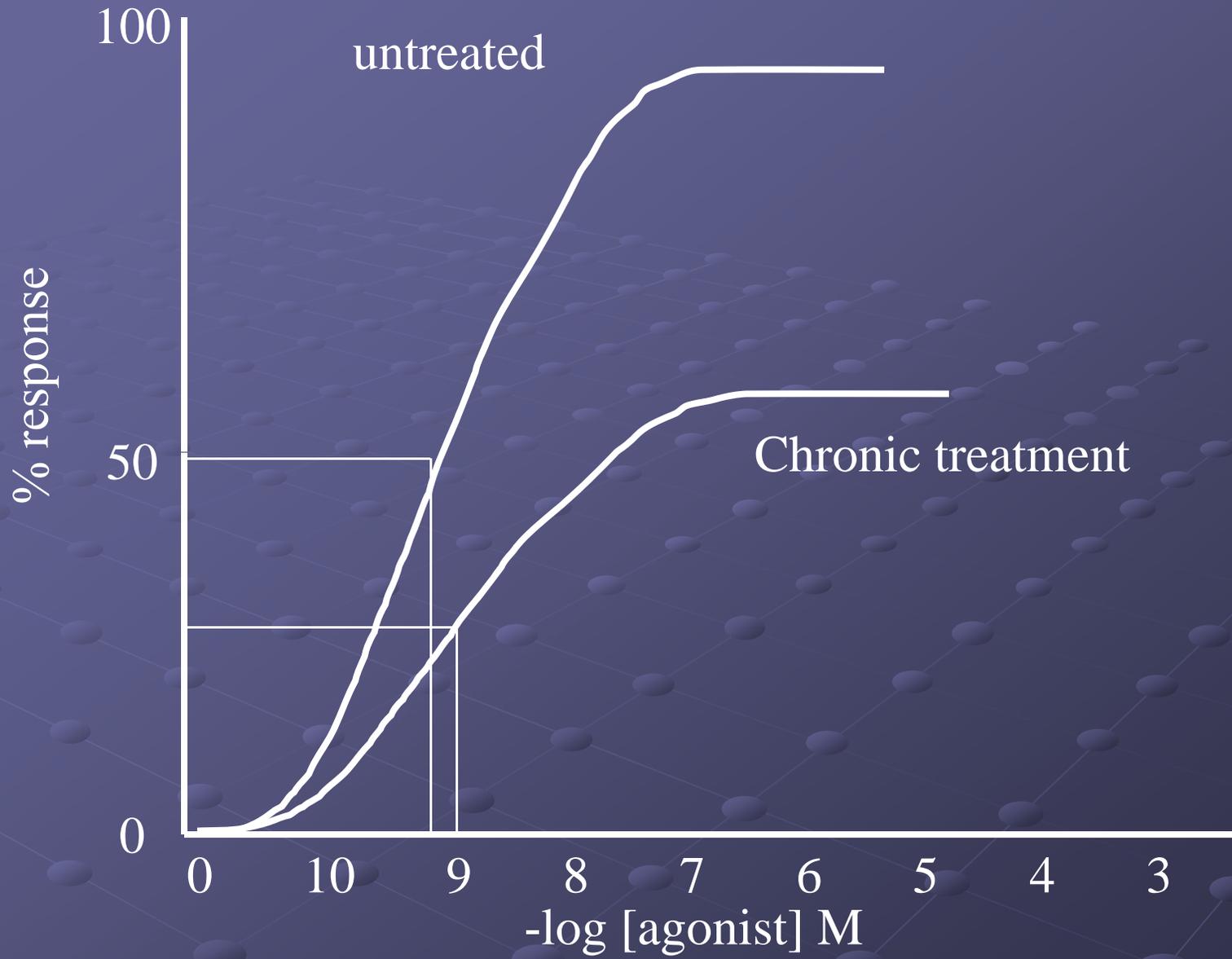
- Degradación proteolítica del receptor
- B_{\max} puede disminuir (~60%); K_D permanece sin variación.

Receptor down-regulation

B/F



Bound



Receptor down-regulation