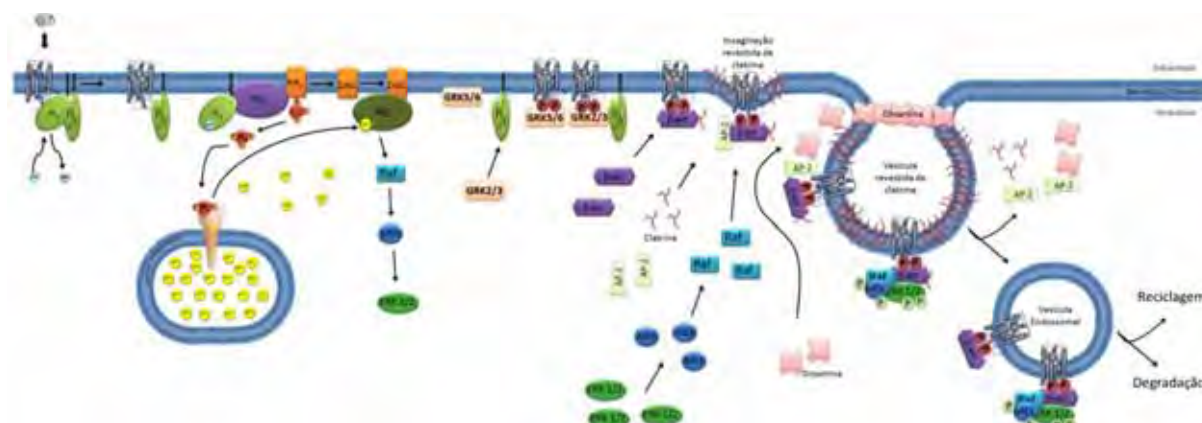


Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Vanessa Lima

Investigação de agonismo tendencioso
em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores



Botucatu – SP

2012

Vanessa Lima

**Investigação de agonismo tendencioso
em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, Área de
concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Lima, Vanessa.

Investigação de agonismo tendencioso em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores /
Vanessa Lima. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências
de Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo

Capes: 21005001

1. Farmacologia. 2. Medicamentos – Utilização. 3. Drogas – Dosagem.

Palavras-chave: Adrenoceptores α_1 ; Agonismo tendencioso; Feniletilaminas;
Imidazolininas; Modelo operacional; Taquifilaxia.

Agradecimentos

A Deus, acima de tudo.

À minha mãe que está sempre do meu lado.

Ao meu namorado Guilherme, por entender as horas gastadas na realização deste trabalho e por estar sempre me incentivando. Te amo!

Ao meu orientador pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colegas de laboratório Juliana Akinaga, Fernanda Diehl, Luiz Ricardo Kiguti, Enio Pacini, Carlos Alberto Ribeiro pelo companheirismo no dia a dia do laboratório, pelas risadas e pelas proveitosas discussões de farmacologia.

Aos funcionários do Departamento, Luis, Paulo e Cristina Murcia por manterem o departamento funcionando. E à Flávia Hebelers Barbosa Trovão, especialmente por sua ajuda na padronização dos experimentos.

Ao professor Ciro Moraes de Barros, por nos permitir usar seus equipamentos e as instalações de seu laboratório.

Aos orientados do professor Ivan de Godoy Maia, em especial à Juliana Bravo e Flavio Sasaki, do departamento de Genética pelo auxílio na amplificação dos vetores.

À CAPES pelo suporte financeiro.

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar nos sonhos que se tem
ou que os seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vais ser alguém...”*

Quem acredita sempre alcança”

Renato Russo

Sumária

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	11
1.1 GPCRs ou 7TMRs	11
1.2 Adrenoceptores	13
1.3 Os α_1 -adrenoceptores.....	13
1.4. Os α_1 -adrenoceptores como alvos terapêuticos.....	14
1.5 Agonistas de α_1 -adrenoceptores	15
1.6 Vias de Sinalização	17
1.6.1 Via de sinalização dependente de proteína G	17
1.6.2 Via de sinalização dependente de β -arrestina	20
1.7 Estados conformacionais dos 7TMRs	25
1.8 Teoria da Ocupação	26
1.9 Modelo Operacional	29
1.10 Agonismo tendencioso	31
1.11 Análise de agonismo tendencioso	35
1.11.1 Gráfico de tendência (<i>Bias Plot</i>).....	35
1.11.2 Atividade Relativa Intrínseca (<i>RAi</i>).....	36
1.11.3 Razões de τ	37
1.11.3 Razões de τ/K_A	38
1.11.4 Atividade Relativa Intrínseca (<i>RAi</i>) baseada no Modelo Operacional.....	39
1.12 Evidências de agonismo tendencioso em α_1 -adrenoceptores	40
2. Objetivo	41
2.1 Objetivo Geral:	41
2.2 Objetivos específicos:.....	41
3. Material e métodos.....	42
3.1 Cultura de Células HEK293.....	42
3.2 Vetores e Amplificação de DNA plasmidial por Maxiprep	42
3.3 Transfecções	43
3.4 Preparação de Membrana das células HEK293	43

3.5 Ensaio de ligação com o radioligante [³ H]prazosin em preparações de membrana de células HEK293	44
3.6 Mobilização de concentrações intracelulares de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _i) induzida por agonistas de α_1 -adrenoceptores	46
3.7 Internalização dos α_{1A} - ou α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293 induzido por agonistas de α_1 -adrenoceptores	48
3.8 Análise do agonismo tendencioso.....	49
3.8.1 Análise qualitativa do agonismo tendencioso	49
3.8.2 Análise quantitativa do agonismo tendencioso (Modelo Operacional)	50
3.8.2.1 Razões de τ	50
3.8.2.1 Razões de τ/K_A	50
3.9 Experimentos de contração de músculos lisos de rato	51
3.9.1 Modelo operacional aplicado aos ensaios de contração	52
3.10. Drogas e reagentes.....	53
3.11. Análise Estatística	54
4. Resultados	55
4.1 Expressão dos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293	55
4.2 Mobilização de [Ca ²⁺] _i induzida por agonistas de α_1 -adrenoceptores.....	57
4.3 Internalização dos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores induzida por agonistas de α_1 -adrenoceptores	61
4.4 Análise qualitativa do agonismo tendencioso	66
4.5 Análise quantitativa do agonismo tendencioso	68
4.5.1 Razões de τ	68
4.5.2 Razões de τ/K_A	72
4.6 Repercussões funcionais do agonismo tendencioso da oximetazolina em α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293.....	76
4.7 Repercussões funcionais do agonismo tendencioso da oximetazolina em α_{1B} -adrenoceptores nativos de baço de rato	78
4.8 Comparação do $\text{Log}(\tau/K_A)$ de agonistas de α_1 -adrenoceptores em receptores nativos do rato e humanos recombinantes	84
5. Discussão.....	93
6. Conclusões	101
7. Referências Bibliográficas.....	102
Apêndice A – Como calcular o agonismo tendencioso com o software GraphPad Prism	110
Apêndice B – Curvas concentração resposta de mobilização de [Ca²⁺]_i e Internalização de α_{1A}- e α_{1B}-adrenoceptores	120

<i>Apêndice C – Comparação $\Delta\log(\tau/K_A)$ de internalização com $[Ca^{2+}]_i$, cAMP e ECAR de Evans et al. (2011) em α_{1A}-adrenoceptores humanos recombinantes</i>	123
--	------------

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura secundária e terciária tridimensional dos 7TMRs. Em (A), está representada a estrutura secundária dos 7TMRs, onde podem ser observados os sete domínios transmembrana (TM1-7) interligados por três alças hidrofílicas intracelulares (ICL) e extracelulares (ECL) (Modificado de Karnik *et al.* (2003)). Em (B), está representada a estrutura terciária dos 7TMRs, onde o arranjo espacial dos sete domínios transmembrana em α -hélice se agrupam em forma de barril. A porção transmembrana (TM) pode ser dividida em dois módulos. O módulo EC (EC e região TM-EC) é responsável pela ligação de diversos ligantes e tem diversidade estrutural mais alta, enquanto que o módulo IC (IC e regiões TM-IC) está envolvido com os efetores *downstream* incluindo a proteína G e β -arrestinas e é mais conservado entre os 7TMRs, mas é submetido a maiores mudanças conformacionais na ativação do receptor. Em azul, estão representadas regiões altamente conservadas e funcionalmente importantes na classe das rodopsinas (Modificado de Katritch *et al.* (2012)). 12

Figura 2. A família dos adrenoceptores é dividida em três subfamílias que se ligam preferencialmente a diferentes proteínas G (Modificado de Zhong e Minneman (1999)). 13

Figura 3. Estrutura química representativa de agonistas de α_1 -adrenoceptores da classe das feniletilaminas (A) e imidazolininas (B). Em (A), a presença de hidroxilas (OH) nas posições 3 (meta) e 4 (para) do grupamento aromático é a estrutura identificadora (anel o-dihidroxibenzeno ou catecol) das catecolaminas. Encontram-se também identificados os carbonos α e β , sendo esse último, frequentemente hidroxilado nas catecolaminas (exceto na dopamina). Em (B) está representado o anel imidazólico presente numa série de agonistas seletivos de α -adrenoceptores (Estruturas criadas com o programa ACD/ChemSketch v12.01). 15

Figura 4. Estruturas químicas dos agonistas de α_1 -adrenoceptores comumente utilizados: as feniletilaminas noradrenalina, fenilefrina, dopamina e metoxamina, as imidazolininas A61603, oximetazolina e nafazolina (Estruturas criadas com o programa ACD/ChemSketch v12.01). 16

Figura 5. Estrutura terciária da proteína G heterotrimérica determinada por cristalografia com resolução de 2.0Å. A subunidade α está representada em verde, a subunidade β em amarelo e a subunidade γ em vermelho. Em azul está representada a região da subunidade

α que interage com a subunidade β . O resíduo de guanosina se liga à subunidade α entre o domínio helical e o domínio GTPase. Em (A), o complexo pode ser visto por baixo do eixo do domínio β -propulsor. Em (B), o mesmo complexo foi rotacionado 70° (Lambright *et al.*, 1996). 18

Figura 6. Ilustração esquemática do ciclo de ativação da proteína G. Em (A), desenho esquemático de uma proteína G inativa ancorada à membrana e em (B), proteína G ativa após a ligação do agonista. 18

Figura 7. Ilustração esquemática da resposta intracelular canônica desencadeada pela ativação de α_1 -adrenoceptores. Os α_1 -adrenoceptores se acoplam às proteínas G_q ativando a fosfolipase $C\beta$ (PLC) que cliva o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) levando a formação de dois segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3). O IP_3 se difunde ao citoplasma e promove a liberação de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático. O DAG juntamente com o Ca^{2+} ativa a proteína kinase C (PKC), responsável por fosforilar outras proteínas intracelulares, inclusive desencadear cascatas de MAP kinases como a ERK1/2. 20

Figura 8. Estrutura tridimensional da β -arrestina determinada por cristalografia com resolução de 1.9Å (A) e a ilustração esquemática do provável mecanismo de ligação da β -arrestina ao receptor (B) (Han *et al.*, 2001). 21

Figura 9. Ilustração esquemática do papel das β -arrestinas na dessensibilização e internalização e sinalização de 7TMRs. Após a formação do complexo agonista-receptor, os receptores são fosforilados pelas GRKs (GRK2/3 ou GRKs 5/6). As β -arrestinas se ligam ao receptor fosforilado impedindo o acoplamento de proteínas G ao receptor. As β -arrestinas atuam como proteínas adaptadoras se ligando à maquinaria de endocitose, como a clatrina e a proteína adaptadora AP2. A dinamina estrangula a vesícula revestida de clatrina internalizando o receptor, que pode sofrer reciclagem ou degradação. A β -arrestina também pode atuar como proteína de suporte (*scaffold proteins*) na cascata de MAPKs ERK1/2. ... 24

Figura 10. Eficácia pluridimensional em escala celular. O agonista se liga ao receptor e estabiliza uma conformação ativa do receptor (o receptor se isomeriza) produzindo uma eficácia intrínseca (ε). Essa conformação leva a ativação de vias de sinalização intracelular e a presença de várias eficácias associadas a cada uma das vias de sinalização. Essas várias eficácias podem ser um possível substituto para a eficácia intrínseca. A eficácia final da célula é a soma das eficácias obtidas em cada uma das vias de sinalização e pode ser descrita como sendo a eficácia (e) de Stephenson (Kenakin, 2009). 29

Figura 11. Sinalização de 7TMRs por via dependente de proteína G ou de β -arrestina. Em (A), agonista que ativa indistintamente ambas as vias dependentes de proteína G ou dependente de β -arrestina, não apresentando agonismo tendencioso (ligante balanceado). Em (B), agonista tendencioso para a via de sinalização dependente de proteína G. Em (C), agonista tendencioso para a via de sinalização dependente de β -arrestina. 34

Figura 12. Exemplo de um gráfico de tendência para a produção de inositol fosfato (IP1) e de internalização de CCR5 após a estimulação com quimiocinas em células U373 (Modificado de Kenakin *et al.* (2012)). As curvas representam respostas para as duas vias de sinalização nas mesmas concentrações dos agonistas (o agonista de referência é o CCL3). 36

Figura 13. Curvas de saturação de ligação específica do [^{3} H]prazosin em preparação de membrana de células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores. Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, e.p.m. de 3 experimentos. 56

Figura 14. Ensaio cinético típico de mobilização de [Ca^{2+}]_i após estimulação de células HEK293 expressando estavelmente α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes com noradrenalina (3 nM a 10 μ M). A seta indica o momento da administração de noradrenalina. 58

Figura 15. Curvas concentração-resposta para as feniletilaminas (A e B) e imidazolinas (C e D) na mobilização de [Ca^{2+}]_i em células HEK293 expressando os α_{1A} -adrenoceptores (A e C) ou α_{1B} -adrenoceptores (B e D), (30 mil células/poço em placa de 96 poços). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos independentes. Os dados foram normalizados para as respostas máximas da noradrenalina. 59

Figura 16. Curso temporal da internalização de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores induzida pela noradrenalina (10 ou 100 μ M) em células HEK293 transfectadas com α_{1A} - ou α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes (30mil células/poço em placa de 96 poços). A luminescência foi detectada após a incubação e lavagem de anticorpos anti-FLAG M2 conjugados à peroxidase (1:1000). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos. Os asteriscos representam diferenças significativas dos tratamentos temporais em relação ao controle no tempo zero (ANOVA seguida de Dunnett, **p<0.01, ***p<0.001). 62

Figura 17. Curvas concentração-resposta das feniletilaminas (A e B) e imidazolininas (C e D) para internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A e C) ou α_{1B} -adrenoceptores (B e D) humanos recombinantes expressos em células HEK293 (30mil células/poço em placa de 96 poços). A luminescência foi detectada após a incubação e lavagem de anticorpos anti-FLAG M2 conjugados à peroxidase (1:1000). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos. 64

Figura 18. Gráfico de tendência (*bias plot*) para as feniletilaminas noradrenalina, dopamina, fenilefrina e, metoxamina e para as imidazolininas A61603, oximetazolina e nafazolina calculado através da comparação equimolar de um mesmo agonista em duas vias de sinalização diferentes. As curvas representam respostas para ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização mensurados em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). 67

Figura 19. Comparação da sinalização efetiva (σ) das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). A linha que transpassa a intersecção abscissa-ordenada representa a sinalização balanceada. 71

Figura 20. Fatores de tendência (β) das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina ($p < 0.05$). O símbolo ★ indica a preferência exclusiva do agonista para a via para selecionada. 71

Figura 21. Comparação de $\Delta \log \tau / K_A$ das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). A linha que transpassa a intersecção abscissa-ordenada representa a sinalização balanceada. 75

Figura 22. Fatores de tendência ($\Delta \log \tau / K_A$) das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina ($p < 0.05$). O símbolo ★ indica a preferência exclusiva do agonista para a via para selecionada. 75

Figura 23. Ensaio cinético de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ após estimulação com noradrenalina 0.1 μM (A), 1 μM (B), 10 μM (C) e 100 μM (D) em células HEK293 expressando estavelmente α_{1B} -adrenoceptores, e em (E), as respectivas curvas concentração-resposta após tratamento

com noradrenalina 30 μ M ou oximetazolina 30 μ M por 30 minutos. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos. 77

Figura 24. Curvas concentração-resposta consecutivas de noradrenalina ou oximetazolina no baço de rato resultante da ativação de α_{1B} -adrenoceptores. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 4 experimentos. 79

Figura 25. Curvas concentração-resposta de noradrenalina no baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores) pré-tratado com veículo, noradrenalina 100 μ M ou oximetazolina 100 μ M. Em (A), curvas concentração resposta de noradrenalina após tratamento por 5 ou 30 minutos de noradrenalina 100 μ M. Em (B), curvas concentração-resposta de noradrenalina após tratamento por 5 ou 15 minutos de oximetazolina 100 μ M. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos. 81

Figura 26. Curvas concentração-resposta de noradrenalina antes e após tratamento por 15 minutos de oximetazolina 100 μ M na ausência e na presença de prazosin 10 nM pré-incubado por 30 minutos. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos. 82

Figura 27. Curvas concentração-resposta das feniletilaminas (A e B) e imidazolininas (C e D) nas contrações do ducto deferente (α_{1A} -adrenoceptores) (A e C) e baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores) (B e D). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 5 experimentos. Os dados foram normalizados para as respostas máximas da noradrenalina. 85

Figura 28. Curvas concentração-resposta para os agonistas de α_1 -adrenoceptores em ducto deferente de rato utilizadas para o cálculo do coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ pelo modelo operacional. As curvas concentração-resposta das feniletilaminas noradrenalina (A), dopamina (B), fenilefrina (C) e metoxamina (D) e a imidazolina A61603 (E) estão mostradas antes e após o tratamento com fenoxibenzamina (FOB) 10 nM por 15 minutos. As curvas concentração-resposta dos agonistas parciais oximetazolina (F) e nafazolina (G) foram comparados ao agonista de referência noradrenalina. Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 5 experimentos. 88

Figura 29. Curvas concentração-resposta para os agonistas de α_1 -adrenoceptores em baço de rato utilizadas para o cálculo do coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ pelo modelo operacional. As curvas concentração-resposta das feniletilaminas noradrenalina (A) e fenilefrina (C) estão mostradas antes e após o tratamento com fenoxibenzamina (FOB) 10 nM por 15 minutos. As curvas concentração-resposta dos agonistas que não foram agonistas totais, dopamina (B), metoxamina (D), A61603 (E) oximetazolina (F) e nafazolina (G), foram comparados ao agonista de referência noradrenalina. Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 5 experimentos. 89

Figura 30. Comparação do coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ para feniletilaminas e imidazolininas para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A e B) e α_{1B} -adrenoceptores (C e D) vs. coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ obtidos em ensaios de contração de ducto deferente de rato (A e B) e baço de rato (C e D). A linha representa uma correlação perfeita entre as razões testadas. 92

Lista de Tabelas

Tabela 1. Afinidades (pK_i) dos agonistas de α_1 -adrenoceptores em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes obtidas em ensaios de competição pela ligação específica do radioligante [^3H]prazosin.	57
Tabela 2. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para agonistas de α_1 -adrenoceptores nos ensaios de mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	60
Tabela 3. Potência (pEC_{50}), internalização máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para agonistas de α_1 -adrenoceptores para os ensaios de internalização em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	65
Tabela 4. Valores de $\log \tau$ obtidos pelo modelo operacional (valores de K_i (obtidos em ensaios de ligação específica com radioligante) foram utilizados como valores de K_A) nos ensaios de mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de internalização para agonistas de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	69
Tabela 5. Sinalização efetiva (σ) e Fator de tendência (β) ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ -internalização) para agonistas de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	71
Tabela 6. Coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ obtidos pelo modelo operacional (sem utilizar os valores de K_i (obtidos em ensaios de ligação específica com radioligante) como valores de K_A) nos ensaios de mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de internalização para agonistas de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	73
Tabela 7. Coeficiente de transdução normalizado $\Delta \log(\tau/K_A)$ e Fator de tendência ($\Delta \log(\tau/K_A)$) ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ -internalização) para agonistas em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	75
Tabela 8. Potência (pEC_{50}), internalização máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para noradrenalina após tratamento para os ensaios de mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.	78

Tabela 9. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para feniletilamina noradrenalina e a imidazolina oximetazolina na contração do baço de rato (efeito resultante da ativação de α_{1B} -adrenoceptores nativos).	79
Tabela 10. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para feniletilamina noradrenalina após tratamento com noradrenalina 100 μ M ou oximetazolina 100 μ M obtidos em ensaios de contração de baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores nativos). ...	83
Tabela 11. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para agonistas de α_1 -adrenoceptores nas contrações do ducto deferente (α_{1A} -adrenoceptores) e baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores).....	86
Tabela 12. $\text{Log } \tau$, $\text{log } K_A$ e coeficiente de transdução $\text{log}(\tau/K_A)$ obtidos pelo modelo operacional nos ensaios de contração de ducto deferente de rato (α_{1A} -adrenoceptores) e baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores).....	92

Resumo

Agonistas induzem ou estabilizam diferentes conformações de receptores com 7 domínios transmembrana (7TMRs) levando à modulação diferencial das atividades desses receptor. Este fenômeno é conhecido como eficácia colateral ou pluridimensional, seletividade funcional ou agonismo tendencioso. Este trabalho investigou se drogas comumente utilizadas como agonistas de α_1 -adrenoceptores (as feniletilaminas noradrenalina, dopamina, fenilefrina e metoxamina; e as imidazolininas A61603, oximetazolina e nafazolina) apresentam agonismo tendencioso para a via proteína G_q -mobilização de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ou para a internalização dependente de β -arrestina em α_{1A} - ou α_{1B} -adrenoceptores humanos em células HEK293. O agonismo tendencioso foi determinado pela comparação equimolar e quantificado pela comparação das “razões de transdução” τ/K_A ou razões das “eficiências de acoplamento” τ .

Os métodos quantitativos de análise do agonismo tendencioso apontaram perfis semelhantes de seletividade funcional em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores. Em α_{1A} -adrenoceptores, a dopamina apresentou agonismo tendencioso para a internalização, enquanto que a fenilefrina e o A61603 foram tendenciosos para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$. Todas as imidazolininas investigadas foram agonistas tendenciosos na internalização de α_{1B} -adrenoceptores.

Houve repercussões funcionais do agonismo tendencioso observado, uma vez que a oximetazolina promoveu taquifilaxia tanto em respostas mediadas por α_{1B} -adrenoceptores nativos do baço do rato quanto em α_{1B} -adrenoceptores recombinantes humanos indicando que a sua capacidade de induzir internalização de receptores não é restrita a receptores recombinantes. Além disso, houve forte correlação entre os $\log(\tau/K_A)$ de agonistas de α_1 -adrenoceptores em receptores nativos do rato e humanos recombinantes.

Abstract

Agonists induce or stabilize different conformations of 7 transmembrane domain receptors leading to differential modulation of receptor activities, a phenomenon known as collateral or pluridimensional efficacy, functional selectivity or biased agonism. This study investigates if some ligands commonly used as α_1 -adrenoceptors agonists (the phenylethylamines: noradrenaline, dopamine, phenylephrine and methoxamine; and the imidazolines: A61603, oxymetazoline and naphazoline) present biased signaling for G_q protein mediated intracellular calcium mobilization or β -arrestin dependent receptor internalization in human recombinant α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors expressed in HEK293 cells. The biased agonism was determined by equimolar comparison and quantified by transduction ratios (τ/K_A) and coupling efficiency ratios (τ).

Both methods for quantification of biased agonism discriminated similar profiles of functional selectivity in α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors. In α_{1A} -adrenoceptors, dopamine is biased for internalization, but phenylephrine and A61603 were biased for $[Ca^{2+}]_i$ mobilization. On the other hand, all imidazolines were biased agonists for internalization of α_{1B} -adrenoceptors.

There are functional repercussions of the biased agonism presented by oxymetazoline, as this agonist induced tachyphylaxis in responses mediated by native α_{1B} -adrenoceptors of the rat spleen and human recombinant α_{1B} -adrenoceptors expressed in HEK293 cells, indicating that its ability to induce internalization is not restricted to recombinant receptors. In addition, there was a strong correlation between $\log(\tau/K_A)$ of α_1 -adrenoceptor agonists in rat native and human recombinant α_1 -adrenoceptors.

Introdução

1. Introdução

1.1 GPCRs ou 7TMRs

Os Receptores Acoplados a Proteína G (G Protein-Coupled Receptors), também conhecidos como Receptores de 7 Domínios Transmembrana (Seven Transmembrane Receptors - 7TMs ou 7TMRs), são caracterizados por apresentar sete grandes domínios hidrofóbicos, dispostos em conformação de α -hélices, que atravessam a membrana plasmática e que são interligados por alças hidrofílicas intracelulares (ICL) e extracelulares (ECL) (Figura 1).

Os 7TMRs são responsáveis pela transdução de um sinal gerado pela ligação de uma molécula fora da célula em ativação de vias de sinalização no interior da célula. Já foram identificados mais de 800 genes codificadores de 7TMRs humanos que podem ser separados em diversas classes por diferentes tipos de classificação (Attwood e Findlay, 1994; Foord *et al.*, 2005; Fredriksson *et al.*, 2003; Kolakowski, 1994).

A classe da rodopsina, que também pode ser classificada como classe A ou tipo rodopsina, é a maior de todas as classes de 7TMRs e são alvos farmacológicos de aproximadamente 30% das drogas utilizadas na terapêutica (Overington *et al.*, 2006). A classe da rodopsina se subdivide em grupos e subgrupos dentre os quais se encontram os adrenoceptores (Fredriksson *et al.*, 2003).

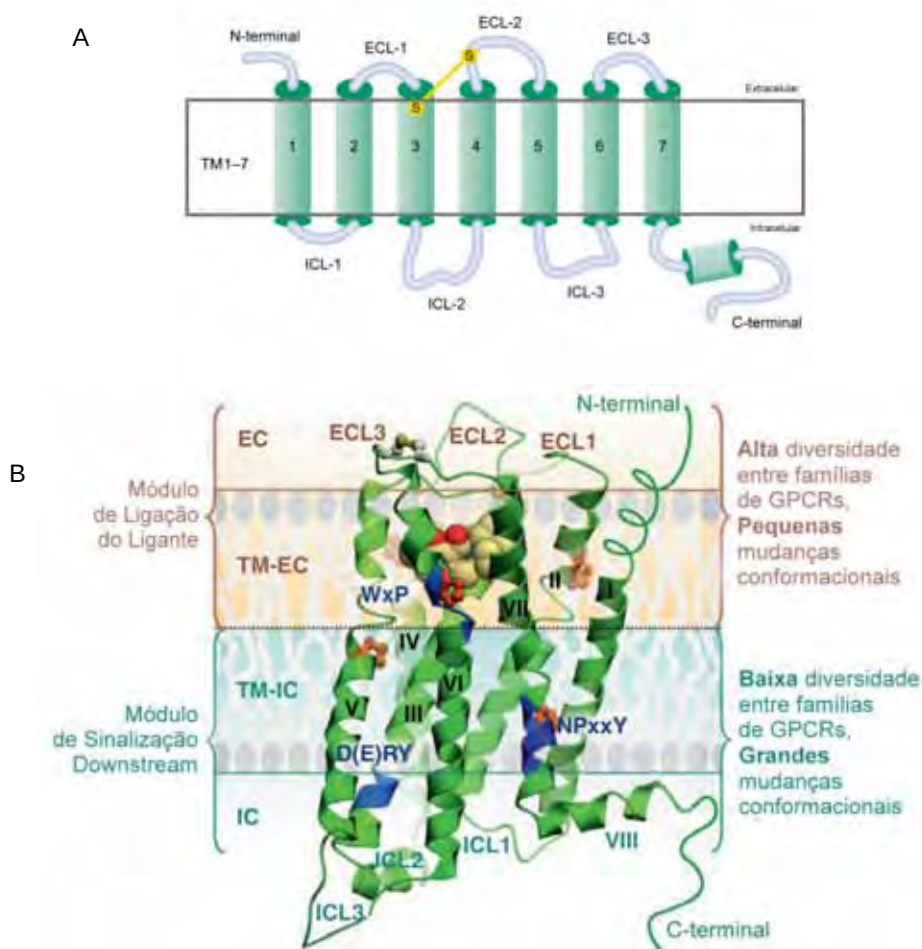


Figura 1. Estrutura secundária e terciária tridimensional dos 7TMRs. Em (A), está representada a estrutura secundária dos 7TMRs, onde podem ser observados os sete domínios transmembrana (TM1-7) interligados por três alças hidrofílicas intracelulares (ICL) e extracelulares (ECL) (Modificado de Karnik *et al.* (2003)). Em (B), está representada a estrutura terciária dos 7TMRs, onde o arranjo espacial dos sete domínios transmembrana em α -hélice se agrupam em forma de barril. A porção transmembrana (TM) pode ser dividida em dois módulos. O módulo EC (EC e região TM-EC) é responsável pela ligação de diversos ligantes e tem diversidade estrutural mais alta, enquanto que o módulo IC (IC e regiões TM-IC) está envolvido com os efetores *downstream* incluindo a proteína G e β -arrestinas e é mais conservado entre os 7TMRs, mas é submetido a maiores mudanças conformacionais na ativação do receptor. Em azul, estão representadas regiões altamente conservadas e funcionalmente importantes na classe das rodopsinas (Modificado de Katritch *et al.* (2012)).

1.2 Adrenoceptores

A família dos adrenoceptores ou receptores adrenérgicos modula os efeitos das catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina e são divididos em três subfamílias: α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}), e β (β_1 , β_2 e β_3) de acordo com suas propriedades farmacológicas, homologia estrutural, e acoplamento a proteína G (Zhong e Minneman, 1999) (Figura 2).

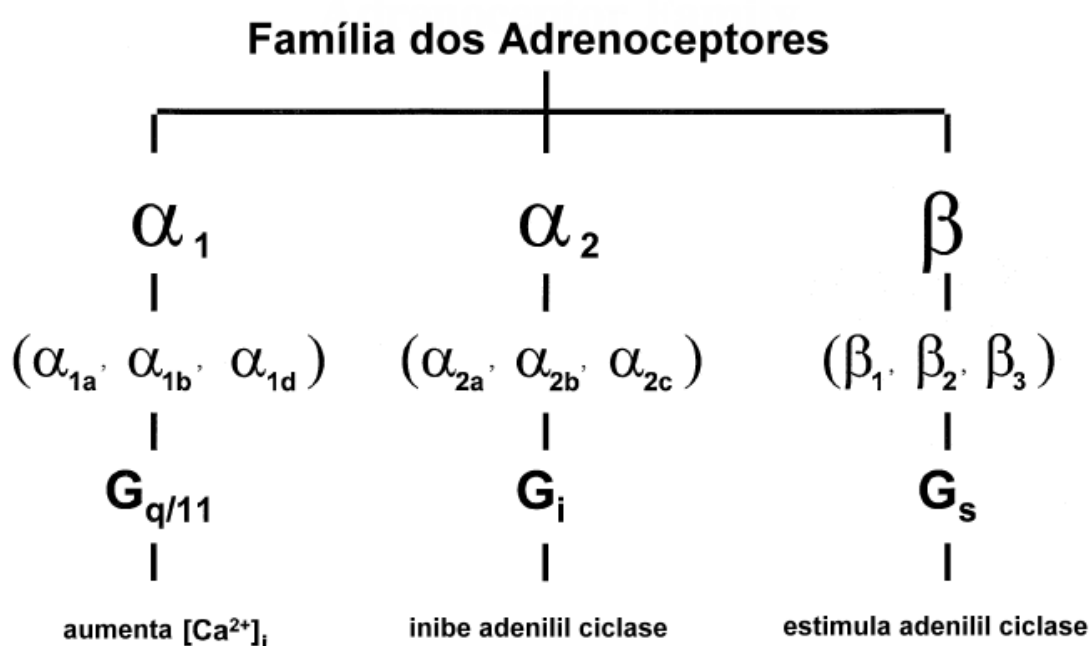


Figura 2. A família dos adrenoceptores é dividida em três subfamílias que se ligam preferencialmente a diferentes proteínas G (Modificado de Zhong e Minneman (1999)).

1.3 Os α_1 -adrenoceptores

Em humanos, os α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -adrenoceptores são codificados por três diferentes genes, localizados nos cromossomos 8 (Schwinn *et al.*, 1990), 5 (Yang-Feng *et al.*, 1990) e 20 (Yang-Feng *et al.*, 1994), respectivamente (para revisão ver (Hieble *et al.*, 1995; Zhong e Minneman, 1999)).

Os α_1 -adrenoceptores são expressos em vários órgãos como cérebro, coração, vasos sanguíneos, fígado, rim, próstata, baço, entre outros órgãos viscerais compostos ao menos em parte por músculo liso. Ao serem ativados pelas catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina, os α_1 -adrenoceptores controlam importantes funções biológicas tais como modulação da neurotransmissão, contrações de músculo liso vascular e visceral, crescimento, diferenciação e divisão celular, regulação da pressão sanguínea, metabolismo da glicose e cronotropismo e inotropismo cardíaco (Cotecchia, 2010; Michelotti *et al.*, 2000).

1.4. Os α_1 -adrenoceptores como alvos terapêuticos

Os α_1 -adrenoceptores são alvos terapêuticos de diversas drogas. Antagonistas destes receptores são utilizados no tratamento de doenças como hipertensão arterial e hipertrofia ou hiperplasia prostática (Liao *et al.*, 2011; Sica, 2005; Warde, 2011). Já os agonistas de α_1 -adrenoceptores são usados na hipotensão e choque (Stewart *et al.*, 2002), e como vasoconstritores localmente aplicados às membranas mucosas nasais e nos olhos promovendo descongestão, e também como midríaticos (Johannssen *et al.*, 1997).

No coração e no cérebro há predominância da expressão dos subtipos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores. Entretanto, a ativação desses subtipos promove ações diferentes. A ativação dos α_{1A} -adrenoceptores resulta em cardioproteção e neuroproteção e drogas que ativem seletivamente α_{1A} -adrenoceptores, mas que não ativem α_{1B} -adrenoceptores, são consideradas drogas promissoras no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e de várias desordens neurológicas (Jensen *et al.*, 2011; Perez e Doze, 2011).

1.5 Agonistas de α_1 -adrenoceptores

Em função de suas estruturas químicas, os agonistas de α_1 -adrenoceptores podem ser classificados em dois grandes grupos: as feniletilaminas (ou fenetilaminas) e as imidazolininas (Figura 3). Entre os agonistas de α_1 -adrenoceptores mais comumente utilizados como ferramentas experimentais estão as feniletilaminas: noradrenalina, dopamina, fenilefrina e metoxamina; e as imidazolininas: A61603, oximetazolina e nafazolina (Figura 4).

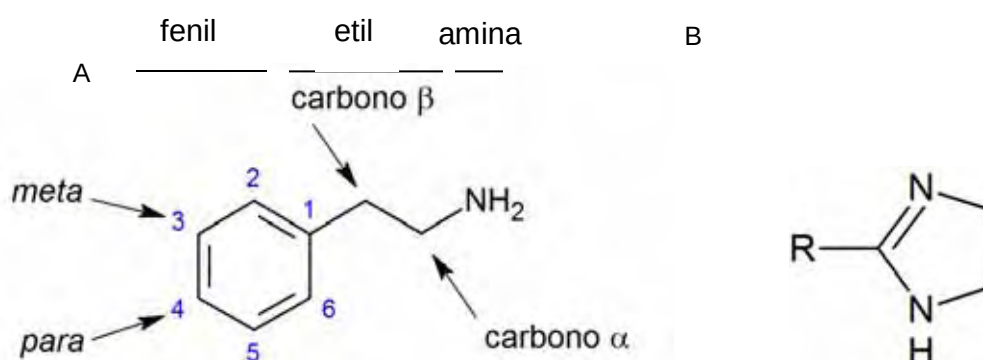


Figura 3. Estrutura química representativa de agonistas de α_1 -adrenoceptores da classe das feniletilaminas (A) e imidazolininas (B). Em (A), a presença de hidroxilas (OH) nas posições 3 (meta) e 4 (para) do grupamento aromático é a estrutura identificadora (anel o-dihidroxibenzeno ou catecol) das catecolaminas. Encontram-se também identificados os carbonos α e β , sendo esse último, frequentemente hidroxilado nas catecolaminas (exceto na dopamina). Em (B) está representado o anel imidazólico presente numa série de agonistas seletivos de α -adrenoceptores (Estruturas criadas com o programa ACD/ChemSketch v12.01).

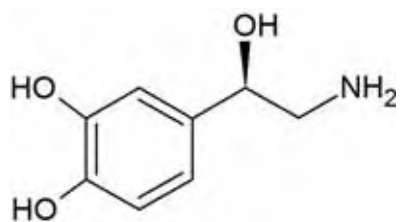
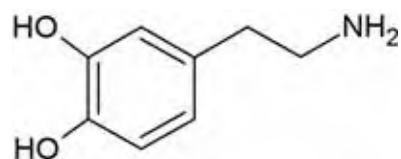
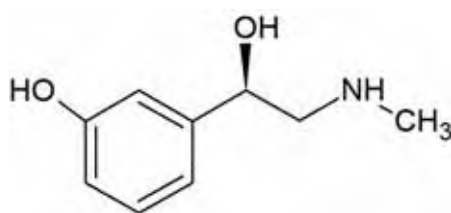
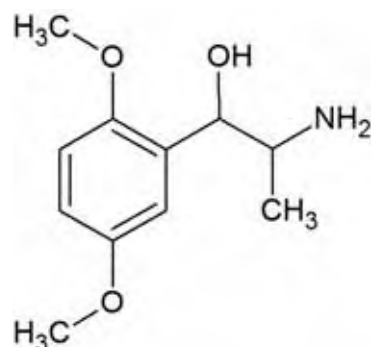
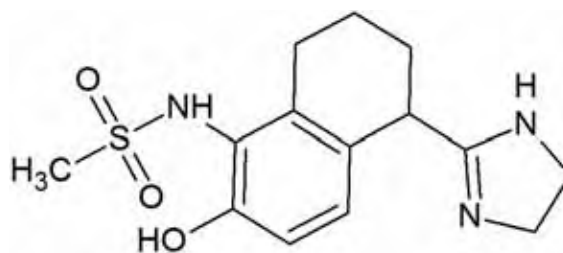
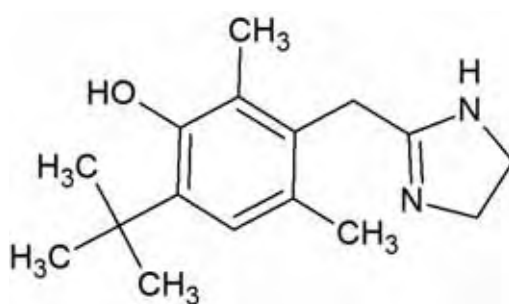
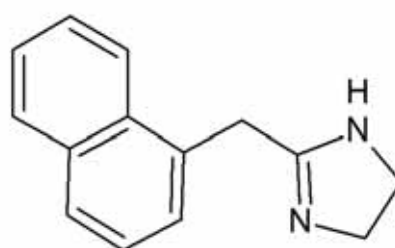
**Noradrenalina****Dopamina****Fenilefrina****Metoxamina****A61603****Oximetazolina****Nafazolina**

Figura 4. Estruturas químicas dos agonistas de α_1 -adrenoceptores comumente utilizados: as feniletilaminas noradrenalina, fenilefrina, dopamina e metoxamina, as imidazolinas A61603, oximetazolina e nafazolina (Estruturas criadas com o programa ACD/ChemSketch v12.01).

1.6 Vias de Sinalização

1.6.1 Via de sinalização dependente de proteína G

O mecanismo canônico de sinalização pelos 7TMRs é a ativação da proteína G ligante de resíduos de guanosina. A proteína G é um heterotrímero composto de subunidades α , β e γ (Figura 5). Em humanos e na maioria das espécies existem mais de 20 subunidades α codificadas por 16 genes, 5 subunidades β codificadas por 5 genes e 12 genes que codificam subunidades γ (McCudden *et al.*, 2005; Oldham e Hamm, 2008). Apesar desta variedade de subunidades, a classificação da proteína G é feita de acordo com o tipo de subunidade α que ela apresenta. Assim, existem quatro principais grupos de proteínas G: G_s (G_s e G_{olf}), G_i (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o , G_{t-rod} , G_{t-cone} , G_{gust} e G_z), G_q (G_q , G_{11} , G_{14} e G_{16}) e $G_{12/13}$ (G_{12} e G_{13}) (McCudden *et al.*, 2005; Oldham e Hamm, 2008).

Quando o receptor está inativo uma molécula de guanosina difosfato (GDP) se encontra ligada à subunidade α , mas na formação do complexo agonista-receptor, o GDP se dissocia e em seu lugar a guanosina trifosfato (GTP) se liga e ativa a subunidade α que se separa de β e γ , interagindo com proteínas efetoras intracelulares, usualmente enzimas e canais iônicos, localizadas na, ou próximos da membrana. As subunidades α da proteína G apresentam atividade catalítica e hidrolisam o GTP, formando GDP. Dessa forma, ao fim da hidrólise, as subunidades α se reassociam às subunidades β e γ e permanecem ligadas ao GDP, retornando ao estado de repouso (Morris e Malbon, 1999) (Figura 6).

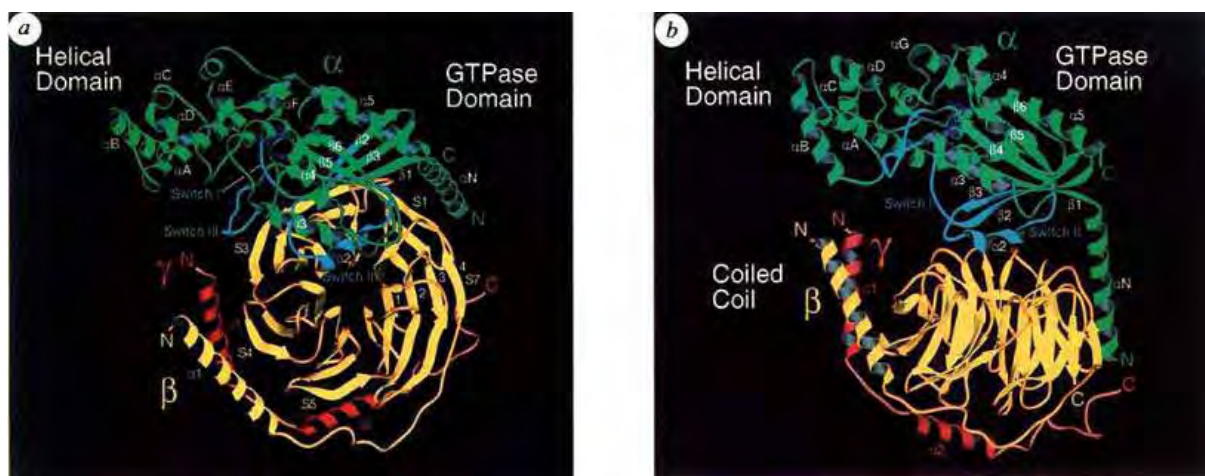


Figura 5. Estrutura terciária da proteína G heterotrimérica determinada por cristalografia com resolução de 2.0Å. A subunidade α está representada em verde, a subunidade β em amarelo e a subunidade γ em vermelho. Em azul está representada a região da subunidade α que interage com a subunidade β . O resíduo de guanosina se liga à subunidade α entre o domínio helical e o domínio GTPase. Em (A), o complexo pode ser visto por baixo do eixo do domínio β -propulsor. Em (B), o mesmo complexo foi rotacionado 70° (Lambright *et al.*, 1996).

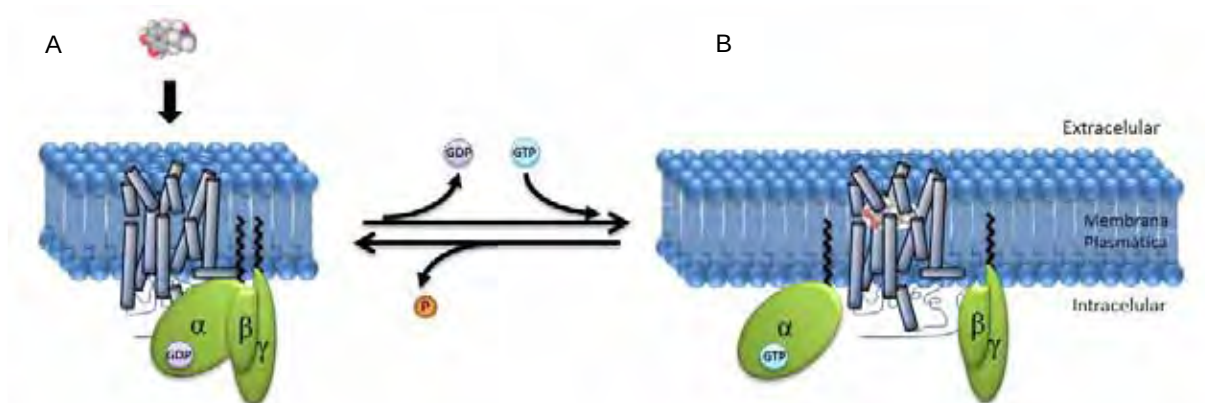


Figura 6. Ilustração esquemática do ciclo de ativação da proteína G. Em (A), desenho esquemático de uma proteína G inativa ancorada à membrana e em (B), proteína G ativa após a ligação do agonista.

Quando ativados, canonicamente, os α_1 -adrenoceptores ativam preferencialmente a proteína G_q levando à hidrólise de um fosfolípide de membrana,

o fosfatidil 4,5-bifosfato (PIP₂) pela fosfolipase C β (PLC β), resultando na formação dos segundo-mensageiros intracelulares inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e o 1,2-diacilglicerol (DAG). O IP₃ é solúvel e se difunde da membrana plasmática e ativa receptores específicos em organelas intracelulares que estocam cálcio (Ca²⁺) promovendo o aumento da concentração citosólica deste íon. O DAG, que é insolúvel e permanece na membrana plasmática, é responsável pela ativação da proteína kinase C (PKC) (Berridge, 2009; Marshall *et al.*, 1999), uma enzima que também é ativada por Ca²⁺ (enzima Ca²⁺-dependente) e fosforila proteínas-alvo importantes nas respostas fisiológicas (Figura 7).

Além da PKC, os três subtipos de α_1 -adrenoceptores são capazes de ativar de forma PKC-dependente alguns membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (mitogen-activated protein kinase, MAPK) como a ERK (extracelular signal-regulated protein kinase, em especial as ERK2 e ERK1, também conhecidas como p⁴²MAPK e p⁴⁴MAPK) (Hein e Michel, 2007; Koshimizu *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2001) (Figura 7).

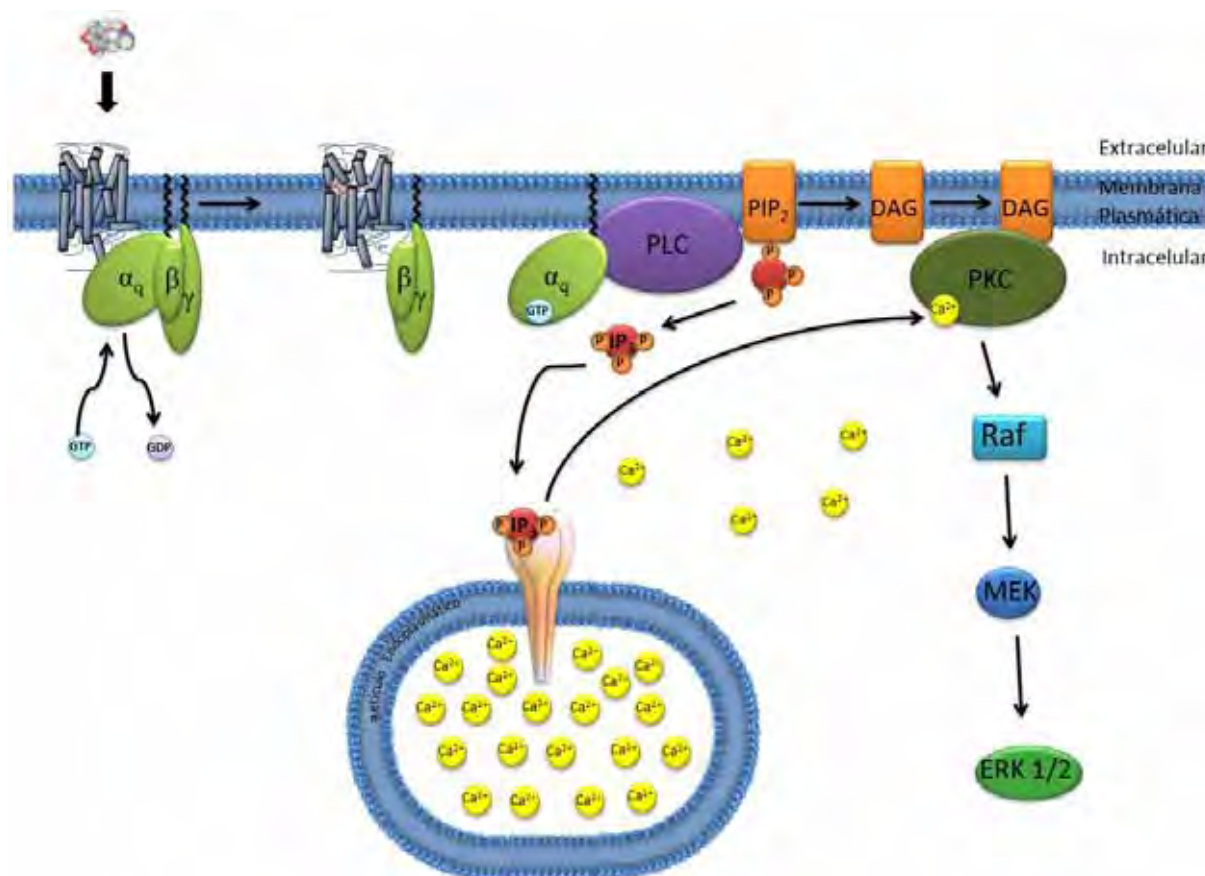


Figura 7. Ilustração esquemática da resposta intracelular canônica desencadeada pela ativação de α_1 -adrenoceptores. Os α_1 -adrenoceptores se acoplam às proteínas G_q ativando a fosfolipase $C\beta$ (PLC) que cliva o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) levando a formação de dois segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3). O IP_3 se difunde ao citoplasma e promove a liberação de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático. O DAG juntamente com o Ca^{2+} ativa a proteína quinase C (PKC), responsável por fosforilar outras proteínas intracelulares, inclusive desencadear cascatas de MAP quinases como a ERK1/2.

1.6.2 Via de sinalização dependente de β -arrestina

Muitos autores preferem nomear os GPCRs de 7TMRs, devido a capacidade desses receptores promoverem sinalização que independe da proteína G, através do recrutamento das β -arrestinas (para revisão sobre as β -arrestinas ver (Shukla *et al.*, 2011)).

Há 4 membros na família das arrestinas: a arrestina visual (arrestina 1) e arrestina do cone (arrestina 4), cuja expressão é limitada aos bastonetes e cones da retina; e a β -arrestina 1 (arrestina 2) e a β -arrestina 2 (arrestina 3) (Figura 8), que são amplamente expressas em todos os tipos celulares (Barki-Harrington e Rockman, 2008; Kohout *et al.*, 2001).

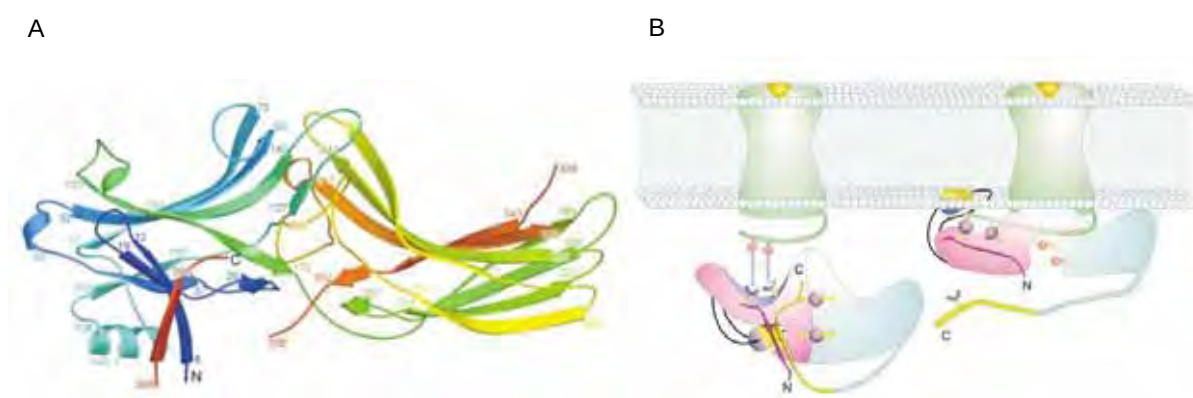


Figura 8. Estrutura tridimensional da β -arrestina determinada por cristalografia com resolução de 1.9Å (A) e a ilustração esquemática do provável mecanismo de ligação da β -arrestina ao receptor (B) (Han *et al.*, 2001).

O papel das β -arrestinas foi primeiramente identificado na dessensibilização de receptores (Figura 9). A dessensibilização de receptores depende classicamente de duas etapas sequenciais (Barki-Harrington e Rockman, 2008; Heitzler *et al.*, 2012). A etapa inicial requer a fosforilação de resíduos de serina e treonina dos receptores pelas quinases de receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptor kinases – GRKs), em especial pelas GRKs 2, 3, 5 e 6 que são amplamente expressas (Zheng *et al.*, 2010). As GRK 2 e 3 são proteínas citosólicas e parecem requerer o recrutamento pela subunidades $G\beta\gamma$ da proteína G, enquanto que as GRKs 5 e 6 são proteínas ancoradas à membrana (Reiter *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2010). De forma geral, a fosforilação pelas GRKs aumenta ainda mais a afinidade das β -arrestinas pelo receptor ativado, apesar de haver evidências

advindas de receptores mutantes de que a fosforilação pelas GRKs pode ser desnecessária para o recrutamento das β -arrestinas (Heitzler *et al.*, 2012). A ligação das β -arrestinas ao receptor é considerada a segunda etapa da dessensibilização, pois impede fisicamente a ligação do receptor à proteína G. Entretanto, nem sempre os receptores recrutam as β -arrestina 1 e β -arrestina 2 de maneira semelhante, e isto permite à classificação dos receptores segundo este recrutamento. Alguns receptores recrutam com maior afinidade a β -arrestina 2 do que a β -arrestina 1, e neste caso a ligação é transiente, sendo classificados como receptores de classe A. Outros receptores parecem recrutar ambas as β -arrestinas com mesma afinidade e com uma ligação mais estável, sendo chamados de receptores de classe B (DeFea, 2011; Kohout *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 2000).

Outro importante papel das β -arrestinas é a internalização ou endocitose dos 7TMRs (Figura 9). As β -arrestinas funcionam como proteínas adaptadoras que associam os receptores à maquinaria de endocitose dependente de clatrina. As β -arrestinas se ligam à clatrina através da proteína adaptadora AP-2, que também está envolvida na iniciação da invaginação da membrana plasmática revestida de clatrina (Barki-Harrington e Rockman, 2008; Luttrell e Lefkowitz, 2002). A endocitose da vesícula revestida de clatrina é dependente da dinamina que também se liga ao complexo da proteína adaptadora AP-2 (Luttrell e Lefkowitz, 2002). Uma vez internalizado, os 7TMRs sofrem reciclagem para a membrana plasmática ou degradação.

As β -arrestinas também atuam como proteína de suporte (*scaffold protein*) para outras vias de sinalização. Isto é, a β -arrestina funciona como uma estrutura à qual outras proteínas de uma cascata de sinalização podem se ligar para aumentar a sua eficiência e/ou especificidade (Hall e Lefkowitz, 2002). Uma das sinalizações

via β -arrestina mais estudada é a das MAPKs ERK1/2 (Figura 9). Entretanto, é importante observar que há uma diferença espaço-temporal entre as ERKs fosforiladas via β -arrestina e as ERKs fosforiladas por mecanismos dependentes de PKC (via proteína G), levando a ativação de fatores de transcrição de forma diferenciada. A fosforilação da ERK via proteína G é rápida e é translocada para o núcleo enquanto a fosforilação de ERK via β -arrestina é mais lenta e a kinase é retida no citosol (Cervantes *et al.*, 2010).

Recentemente foi proposto que as β -arrestinas além de impedir a formação de segundos mensageiros (por impedir fisicamente o acoplamento de proteínas G), podem atuar como proteína de suporte para fosfodiesterases e diacilglicerol kinases (DGKs) aumentando a eficiência da degradação de segundos mensageiros cAMP e diacilglicerol (DAG), respectivamente (Barki-Harrington e Rockman, 2008; Shenoy e Lefkowitz, 2011).

A ativação de adrenorreceptores α_1 pode levar ao recrutamento de β -arrestina levando à dessensibilização e internalização dos receptores (Cotecchia, 2010; Garcia-Sainz *et al.*, 2000). Entretanto, o papel das β -arrestinas como proteínas de suporte para outras vias de sinalização como as MAPKs ERK1/2 após ativação dos α_1 -adrenorreceptores ainda é pouco explorado (Cotecchia, 2010; DeFea, 2011).

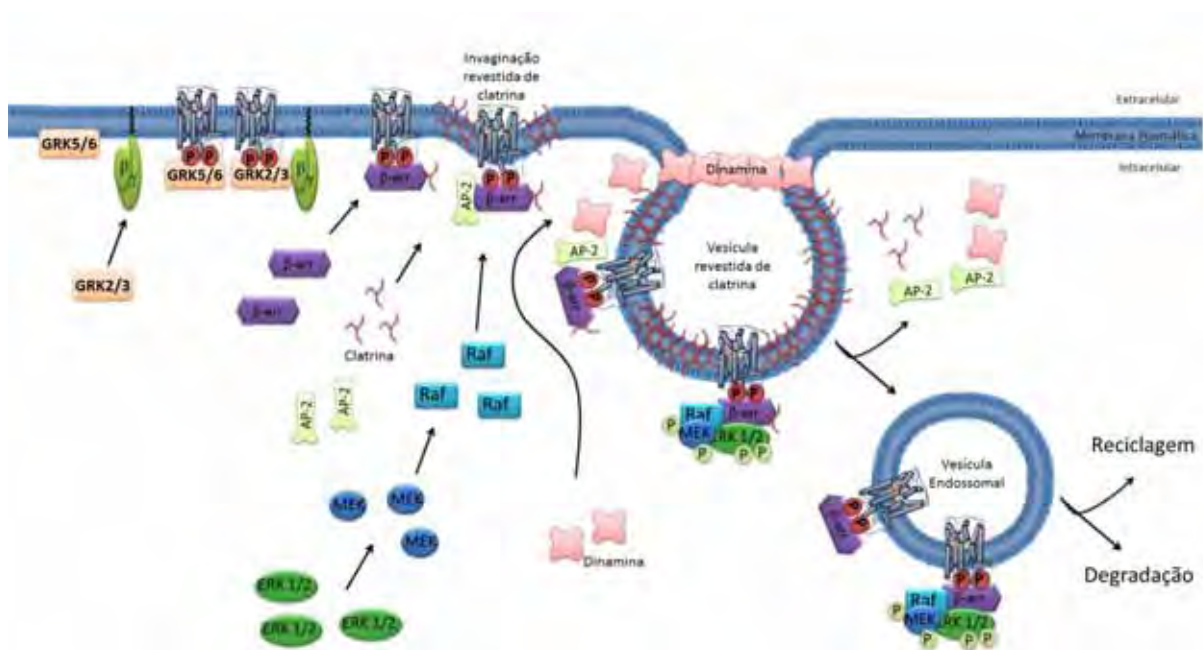


Figura 9. Ilustração esquemática do papel das β -arrestinas na dessensibilização e internalização e sinalização de 7TMRs. Após a formação do complexo agonista-receptor, os receptores são fosforilados pelas GRKs (GRK2/3 ou GRKs 5/6). As β -arrestinas se ligam ao receptor fosforilado impedindo o acoplamento de proteínas G ao receptor. As β -arrestinas atuam como proteínas adaptadoras se ligando à maquinaria de endocitose, como a clatrina e a proteína adaptadora AP2. A dinamina estrangula a vesícula revestida de clatrina internalizando o receptor, que pode sofrer reciclagem ou degradação. A β -arrestina também pode atuar como proteína de suporte (*scaffold proteins*) na cascata de MAPKs ERK1/2.

1.7 Estados conformacionais dos 7TMRs

Os 7TMRs são proteínas com estruturas tridimensionais dinâmicas e flexíveis que apresentam diversas conformações, cada uma com uma energia distinta como resultado de ligações químicas intracelulares e interações iônicas (Deupi e Kobilka, 2010).

Uma descrição simples e ilustrativa que ajuda a compreender as repercussões da existência de múltiplas conformações do receptor é o Modelo de “Dois Estados” (ver a perspectiva histórica em Shelley e Cull-Candy (2010) e Leff (1995)), o qual propõe que na ausência de um ligante (L) os receptores existem em duas conformações em equilíbrio: um estado inativo (*“off” state*) (R) e um estado ativo (*“on” state*) (R*). Na presença de um ligante, dois mecanismos podem ocorrer para ativar um receptor: indução conformacional ou seleção conformacional. Na indução conformacional, o ligante (L) se liga ao estado inativo (R), forma um complexo R.L e induz a ativação do receptor no complexo R*.L, estabilizando-o. Na seleção conformacional, o ligante (L) se liga preferencialmente e estabiliza a conformação ativa (R*) pré-existente do receptor, formando o complexo R*.L. (Deupi e Kobilka, 2010; Giraldo, 2004). Nesse modelo, ligantes que estabilizam R* e deslocam o equilíbrio para o estado ativo comportam-se como agonistas; aqueles que se ligam indistintamente a R e R* sem resposta mensurável e que impedem as ações dos agonistas são chamados de antagonistas; os agonistas inversos são ligantes que se comportam como antagonistas quando a atividade constitutiva dos receptores é pequena, mas que em sistemas com atividade constitutiva mensurável esses ligantes se ligam preferencialmente a R, deslocam o equilíbrio para o estado inativo e reduzem a atividade constitutiva (Gesty-Palmer e Luttrell, 2011).

Entretanto, os receptores não se apresentam em apenas dois estados conformacionais R ou R*. Acredita-se que os receptores existam sob diversos estados conformacionais que podem ser estabilizados de acordo com o ligante resultando em ativações preferenciais de efetores intracelulares como proteínas G ou β -arrestinas, por exemplo, o que poderia levar a diferentes efeitos farmacológicos intracelulares. (Deupi e Kobilka, 2010; Vaidehi e Kenakin, 2010).

1.8 Teoria da Ocupação

Historicamente, foi A.J. Clark quem introduziu a análise quantitativa na interação droga-receptor (Clark (1933) apud Kenakin (2004)). De acordo com Clark a interação entre uma droga A e um receptor R segue a Lei de Ação das Massas e é possível aplicar uma das isothermas de adsorção de Langmuir para explicar a ocupação (ρ) dos receptores. Para Clark, a resposta decorrente da adição de uma droga é diretamente proporcional ao número de receptores ocupados pela droga.



$$Resposta = \rho = \frac{[A \cdot R]}{[R_t]} = \frac{[A]}{[A] + K_A} \quad [2]$$

onde $[A]$ é a concentração da droga agonista, K_A ($K_A = k_2/k_1$) é a constante de dissociação do complexo agonista-receptor no equilíbrio, $[R_t]$ é a densidade total de receptores e $[A \cdot R]$ é a concentração de complexo droga-receptor.

Para explicar como drogas que apesar de promoverem a ocupação total dos receptores não são capazes de promover respostas máximas, Ariëns introduziu

uma constante de proporcionalidade à equação [2] descrita por Clark, a atividade intrínseca (α), que descreve a quantidade de resposta promovida por unidade de complexo droga-receptor formado (Ariens (1954) apud Kenakin (2004)). Entretanto, Ariens não alterou o paradigma de que era necessária a ocupação máxima dos receptores para a indução da resposta máxima do tecido.

$$Resposta = \frac{\alpha \times [A \cdot R]}{[R_t]} = \frac{\alpha \times [A]}{[A] + K_A} \quad [3]$$

onde $[A]$ é a concentração da droga agonista, K_A é a constante de dissociação do complexo agonista-receptor no equilíbrio, $[R_t]$ é a densidade total de receptores $[A \cdot R]$ é a concentração de complexo droga-receptor e α é a atividade intrínseca (Ariens, 1954).

Posteriormente, Stephenson introduziu um parâmetro chamado estímulo (*stimulus* - S) e o importante conceito de eficácia (e) que indica o poder da droga produzir uma resposta em um tecido (Stephenson, 1956) (Figura 10). Uma vez que a resposta é uma função do estímulo (S), respostas máximas poderiam ser obtidas mesmo quando agonistas ocupam uma pequena fração de receptores. Além disso, a introdução do conceito S elimina a necessidade da existência de uma relação linear entre a ocupação do receptor e a resposta.

$$S = \frac{e \times [A \cdot R]}{[R_t]} = \frac{e \times [A]}{[A] + K_A} \quad [4]$$

$$Resposta = f(S) = f \left[\frac{e \times [A]}{[A] + K_A} \right] \quad [5]$$

onde $[A]$ é a concentração do agonista, K_A é a constante de dissociação do complexo agonista-receptor no equilíbrio, $[R_t]$ é a densidade total de receptores, $[A \cdot R]$ é a concentração de complexo droga-receptor e e é a eficácia (Stephenson, 1956).

Entretanto, a eficácia (e) é um parâmetro tecido-dependente. Desta forma, Furchgott introduziu o parâmetro de eficácia intrínseca (ε) que pode ser definida como a capacidade inerente do agonista de produzir uma resposta a partir de um único receptor ativado (Furchgott, 1966) (Figura 10).

$$e = \varepsilon \times [R_t] \quad \text{ou} \quad \varepsilon = \frac{e}{[R_t]} \quad [6]$$

$$Resposta = f \left[\frac{[A] \times \varepsilon \times [R_t]}{[A] + K_A} \right] \quad [7]$$

onde $[A]$ é a concentração da droga agonista, K_A é a constante de dissociação do complexo agonista-receptor no equilíbrio, $[R_t]$ é a densidade total de receptores, e é a eficácia e ε é a eficácia intrínseca.

Assim, de acordo com a Teoria Clássica da Ocupação dos Receptores, o complexo droga-receptor apresenta duas propriedades moleculares que são independentes do tipo celular ou tecido onde estão expressas: a afinidade (K_A) e a eficácia intrínseca (ε).

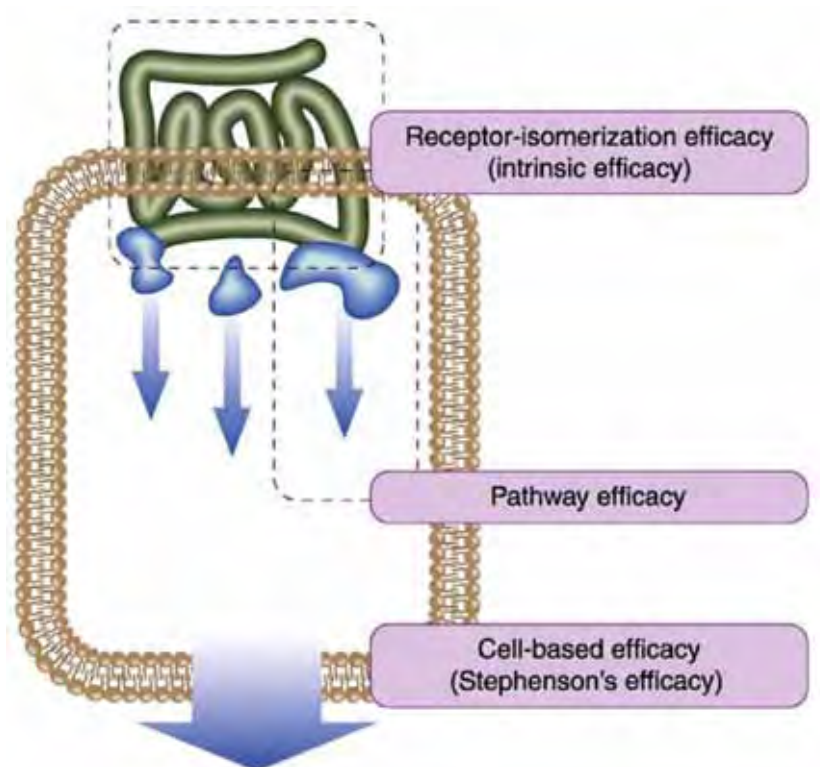


Figura 10. Eficácia pluridimensional em escala celular. O agonista se liga ao receptor e estabiliza uma conformação ativa do receptor (o receptor se isomeriza) produzindo uma eficácia intrínseca (ϵ). Essa conformação leva a ativação de vias de sinalização intracelular e a presença de várias eficácias associadas a cada uma das vias de sinalização. Essas várias eficácias podem ser um possível substituto para a eficácia intrínseca. A eficácia final da célula é a soma das eficácias obtidas em cada uma das vias de sinalização e pode ser descrita como sendo a eficácia (e) de Stephenson (Kenakin, 2009).

1.9 Modelo Operacional

Na década de 1980, um modelo alternativo para mensurar o agonismo foi introduzido: o Modelo Operacional de Agonismo (Black e Leff, 1983), o qual dispensa o uso da eficácia na interpretação da resposta produzida por um agonista. Este modelo descreve a função do agonista em termos de dois processos hiperbólicos, a interação agonista-receptor e a subsequente cascata receptor-

transdução de sinal. O Modelo Operacional pode ser descrito pela seguinte equação:

$$Resposta = \frac{E_{max} \times \tau^n \times [A]^n}{(K_A + [A])^n + \tau^n \times K_A^n} \quad [8]$$

onde E_{max} representa a resposta máxima possível do sistema (e não do agonista em questão), K_A é a constante de dissociação no equilíbrio do complexo agonista-receptor, n é a inclinação de transdução, e τ representa a eficácia operacional do agonista.

Essa eficácia operacional τ , originalmente denominada de constante de transdução, pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\tau = \frac{[R_t]}{K_E} \quad [9]$$

onde $[R_t]$ é a densidade de receptores e K_E que é uma constante que relaciona uma quantidade do complexo droga-receptor $[A \cdot R]$ (uma ocupação) à produção de uma resposta. De certa forma, K_E depende da eficácia intrínseca (ε) de um agonista e da habilidade do sistema em converter um estímulo em resposta (Kenakin *et al.*, 2012). Assim τ serve como uma medida da eficácia (e) descrita por Stephenson, pois depende de componentes intrínsecos do receptor e do tecido.

Por ser muito útil na descrição da farmacologia funcional do receptor, esse modelo ganhou aceitação devido a facilidade de calcular a eficácia operacional (τ) e a grande dificuldade de se calcular a eficácia intrínseca (ε) (Kenakin, 2004).

1.10 Agonismo tendencioso

Os conceitos iniciais de eficácia descritos na primeira metade do século passado por Ariëns, Stephenson e Furchgott foram elaborados quando havia poucas maneiras disponíveis de se medir a ativação dos receptores, como por exemplo observações em experimentação com tecidos isolados através da medição de respostas contráteis de músculos lisos. Nesta época, acreditava-se que razões de potências deveriam ser constantes para um determinado receptor e seu conjunto de agonistas, já que os efeitos relacionados ao sistema (densidade de receptores, amplificação do sinal gerado pelos agonistas, etc) seriam cancelados e dariam uma medida de atividade relativa que só dependeria da afinidade e da eficácia (Kenakin, 2011). Em outras palavras, acreditava-se que as eficácias dos agonistas se apresentariam distribuídas de forma linearmente idênticas nas variadas vias de sinalização que resultariam da ativação dos receptores.

No entanto, vários ensaios que medem respostas intracelulares disparadas por um mesmo sistema receptor, como a geração de segundos mensageiros, recrutamento de proteínas acessórias como kinases, β -arrestina, etc, têm mostrado que as razões de potências e/ou eficácias de agonistas nas várias vias de sinalização disparadas pela ativação do receptor não são idênticas e isto está em desacordo com o que o conceito de eficácia linear prevê. Há vários exemplos de reversão de potências de agonistas que não são explicados por amplificação de sinal ou existência de receptores de reserva. Em células LLC-PK1 expressando o receptor PACAP (Polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase pituitária – pituitary adenylate cyclase-activating peptide), os agonistas PACAP-27 e PACAP-28 apresentam reversão de potência nas vias de sinalização de cAMP e de inositol fosfato (Spengler *et al.*, 1993). Já em células U373 expressando receptores de

quimiocina CCR5, diversos agonistas apresentam reversão de potência na formação de inositol fosfato e na internalização (Kenakin *et al.*, 2012). Outros exemplos podem ser vistos em Gesty-Palmer e Luttrell (2011). Além da reversão de potências, vários agonistas de receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C} apresentam reversão nas suas respostas máximas nas vias de sinalização de inositol fosfato e de liberação de ácido araquidônico (Berg *et al.*, 1998). O mesmo foi observado com diversas drogas estimulando células HEK293S expressando β_1 e β_2 -adrenoceptores em suas capacidades de promover acúmulo de cAMP e fosforilação de ERK1/2 (Galandrin e Bouvier, 2006).

Estas reversões de potência ou eficácias não são condizentes com uma única forma ativa do receptor (R*), mas indicam a existência de diversas conformações ativas do receptor sendo que cada conformação pode apresentar perfis de sinalização diferentes (Gesty-Palmer e Luttrell, 2011; Kenakin, 2011). Dessa forma, foi proposto que a eficácia de um agonista é pluridimensional, isto é, não existe uma única eficácia linear para cada par droga-receptor como é proposto pela Teoria Clássica da Ocupação, mas que existem várias eficácias colaterais para cada uma das vias de sinalização disparadas pela ativação do receptor (Kenakin, 2011; Rajagopal *et al.*, 2011) (Figura 10). Este fenômeno é por vezes chamado de eficácia colateral (*colateral efficacy*), seletividade funcional (*functional selectivity*), “agonismo tendencioso” (*biased agonism*), “agonismo ligante-tendencioso” (*ligand-biased agonism*), “sinalização ligante-tendenciosa” (*ligand-biased signalling*), e se referem à habilidade de agonistas induzirem e/ou estabilizarem diferentes conformações do receptor, o que leva à modulação diferencial das atividades do receptor (sinalização, fosforilação, internalização, etc.); em outras palavras, é o processo pelo qual um agonista faz com que o receptor expresse alguns, mas não

todos, dos seus repertórios de atividades através da célula. Desta forma, um agonista pode, por exemplo, ativar preferencialmente a via dependente de proteína G ou dependente da β -arrestina (agonista tendencioso), ou ativar ambos indistintamente (agonista balanceado) (Figura 11). É importante estudar se agonistas exibem tendência para uma via ao invés da outra devido as importantes implicações na farmacologia, no desenvolvimento de drogas e na terapêutica (Kenakin, 2011; Whalen *et al.*, 2011).

Com a descoberta da grande importância das β -arrestinas não apenas na dessensibilização e internalização dos 7TMRs mas também atuando como uma proteína de suporte para diversas cascatas de sinalização, vários trabalhos passaram a investigar as eficácias dos agonistas ativarem diferencialmente a via dependente de proteína G e a dependente de β -arrestina. Por exemplo, foi descoberto que o carvedilol, uma droga utilizada como antagonista de β -adrenoceptores (via proteína G_s e cAMP), é na verdade um agonista tendencioso para a via de sinalização por β -arrestina (Andresen, 2011). Da mesma forma o análogo da angiotensina II, o SII ([Sar¹-Ile⁴-Ile⁸]-Ang II) também foi um agonista tendencioso para a via de sinalização por β -arrestina ao se ligar a receptores AT₁ (Kendall *et al.*, 2011). Vários exemplos do potencial terapêutico de agonistas que apresentam tendência para a sinalização através da proteína G ou β -arrestina podem ser vistos em Whalen *et al.* (2011).

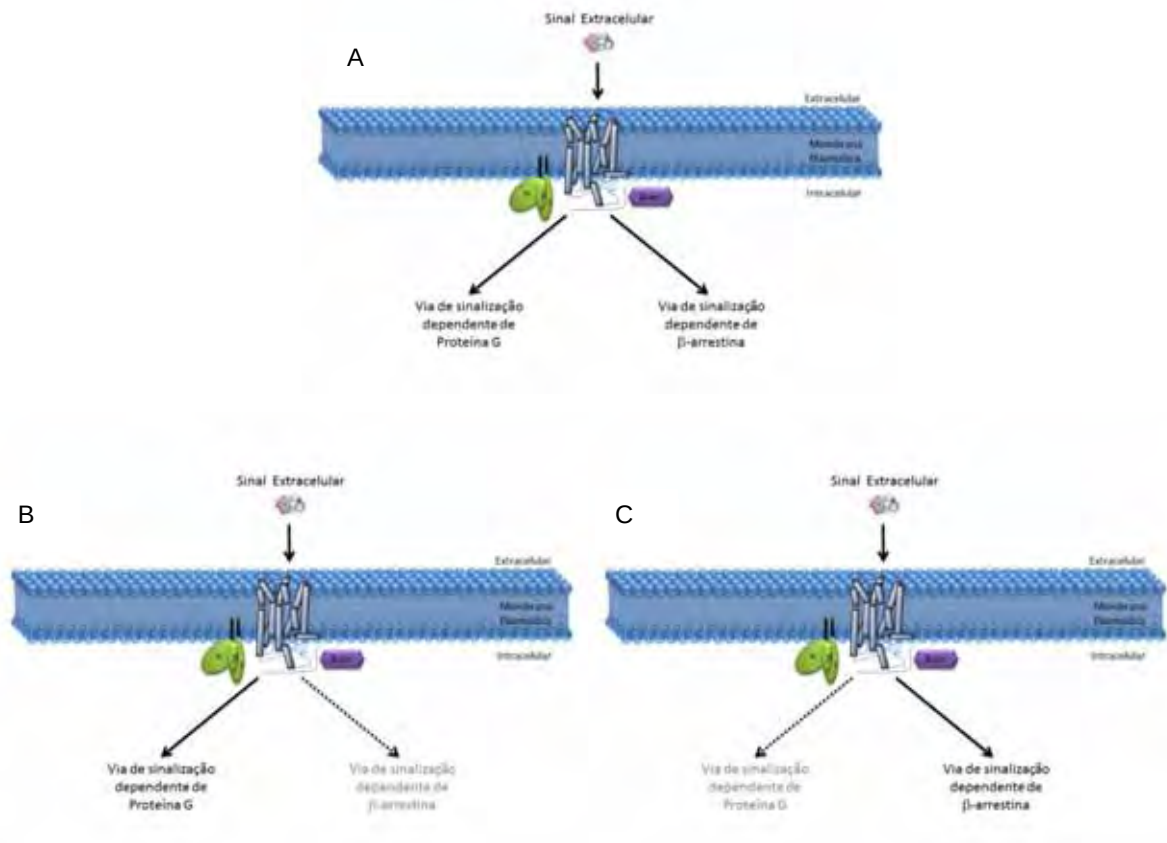


Figura 11. Sinalização de 7TMRs por via dependente de proteína G ou de β -arrestina. Em (A), agonista que ativa indistintamente ambas as vias dependentes de proteína G ou dependente de β -arrestina, não apresentando agonismo tendencioso (ligante balanceado). Em (B), agonista tendencioso para a via de sinalização dependente de proteína G. Em (C), agonista tendencioso para a via de sinalização dependente de β -arrestina.

1.11 Análise de agonismo tendencioso

Uma vez que agonistas podem apresentar eficácias diferentes nas vias de sinalização resultantes da ativação dos seus receptores, é necessário quantificar farmacologicamente estas eficácias diferenciadas. Serão revisados abaixo alguns aspectos teóricos dos principais métodos de quantificação de agonismo tendencioso.

1.11.1 Gráfico de tendência (*Bias Plot*)

A maneira mais simples de análise de agonismo tendencioso é pela comparação equimolar das vias de sinalização, ou seja, num gráfico cartesiano são representadas respostas equimolares das duas vias de sinalização (por exemplo, mobilização de Ca^{2+} intracelular e internalização) para cada agonista criando um gráfico de tendência (*bias plot*) (Kenakin *et al.*, 2012; Rajagopal *et al.*, 2011). Este gráfico é muito ilustrativo, mas não permite a quantificação do agonismo tendencioso (Figura 12).

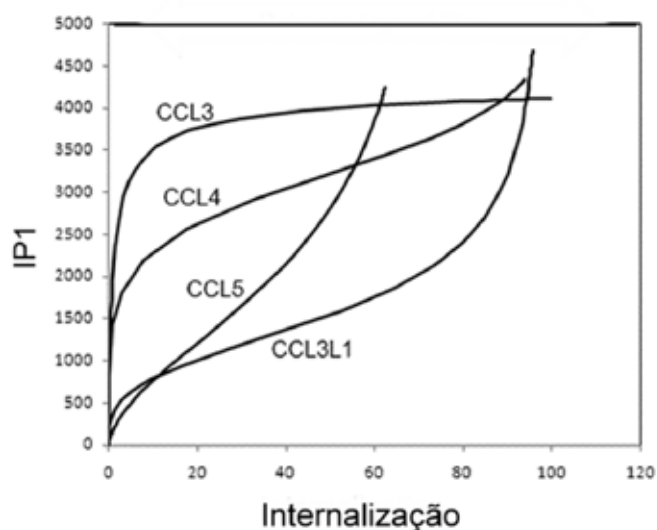


Figura 12. Exemplo de um gráfico de tendência para a produção de inositol fosfato (IP1) e de internalização de CCR5 após a estimulação com quimiocinas em células U373 (Modificado de Kenakin *et al.* (2012)). As curvas representam respostas para as duas vias de sinalização nas mesmas concentrações dos agonistas (o agonista de referência é o CCL3).

1.11.2 Atividade Relativa Intrínseca (RA_i)

Uma maneira de quantificar agonismo tendencioso é através da determinação da Atividade Relativa Intrínseca (RA_i) (Ehlert, 2008; Kenakin *et al.*, 2012; Rajagopal *et al.*, 2011). A estimativa de RA_i , de um agonista em relação a um agonista de referência pode ser feita pela seguinte equação utilizando-se apenas valores de efeito máximo (E_{max}) e de potência (concentração efetiva a 50%, EC_{50}), desde que o coeficiente de inclinação de Hill da curva concentração-resposta não seja diferente da unidade (1.0):

$$RA_i = \frac{(E_{max_{agonista}} / EC_{50_{agonista}})}{(E_{max_{referência}} / EC_{50_{referência}})} = \frac{E_{max_{agonista}} \times EC_{50_{referência}}}{E_{max_{referência}} \times EC_{50_{agonista}}} \quad [10]$$

Baseando-se na RA_i , Rajagopal *et al.* (2011) propuseram uma maneira de quantificar um fator de tendência (β) como uma estimativa de eficácia de um agonista em uma via de sinalização “1” versus outra via de sinalização “2”, em relação a um agonista de referência. O fator de tendência (β) pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\beta = \log \left(\frac{RA_{i \text{ via de sinalização 1, via de sinalização 2; agonista}}}{RA_{i \text{ via de sinalização 1, via de sinalização 2; referência}}} \right) \quad [11]$$

Esta equação [11] também pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$\beta = \log \left(\frac{RA_{i \text{ agonista, referência; via de sinalização 1}}}{RA_{i \text{ agonista, referência; via de sinalização 2}}} \right) \quad [12]$$

1.11.3 Razões de τ

Outra abordagem quantitativa usa o Modelo Operacional de Agonismo (Black e Leff, 1983) para calcular as razões de “eficiências de acoplamento” (τ). A eficiência de acoplamento τ é composta pela eficácia (ε) e um fator de amplificação que é o mesmo para todos os agonistas em um ensaio realizado num mesmo sistema (Rajagopal *et al.*, 2011). Por isso, supõe-se que razões entre $\tau_{\text{agonista}}/\tau_{\text{referência}}$ darão estimativas de $\varepsilon_{\text{agonista}}/\varepsilon_{\text{referência}}$. (Rajagopal *et al.*, 2011).

A habilidade de um agonista em relação a um agonista de referência em ativar as vias de sinalização decorrentes da ativação do receptor é denominada sinalização efetiva (σ_{agonista}) e pode ser determinada pela seguinte equação:

$$\sigma_{agonista} = \log(\tau_{agonista}/\tau_{referência}) \quad [13]$$

Segundo Rajagopal et al., (2011), o fator de tendência β pode ser calculado como a diferença dos fatores de sinalização efetiva σ , pela seguinte equação:

$$\beta_{agonista} = \frac{\sigma_{agonista}^{via\ de\ sinalização\ 1} - \sigma_{agonista}^{via\ de\ sinalização\ 2}}{\sqrt{2}} \quad [14]$$

Entretanto, uma grande limitação deste método é utilizar valores de afinidade determinados no binding (K_I) como medida de afinidade para a determinação da eficácia operacional τ , uma vez que a afinidade para cada via de sinalização pode ser diferente (Kenakin et al., 2012).

1.11.3 Razões de τ/K_A

Outro método de quantificação de agonismo tendencioso é baseado em comparações de razões τ/K_A entre agonistas, onde os valores de $\log(\tau/K_A)$, também denominados de “coeficientes de transdução”, representam a “força” de um dado agonista em ativar uma via de sinalização em um sistema definido (Kenakin et al., 2012; Tschammer et al., 2011).

O valor de $\Delta\log(\tau/K_A)$, também denominado de “coeficiente de transdução normalizado”, descreve a eficiência relativa do agonista em uma dada via comparado a um agonista de referência e pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\Delta \log(\tau/K_A)_{agonista/referência} = \log(\tau/K_A)_{agonista} - \log(\tau/K_A)_{referência} \quad [15]$$

A partir da subtração dos $\Delta \log(\tau/K_A)$ é obtido o fator de tendência $\Delta \Delta \log(\tau/K_A)$ pela seguinte equação:

$$\Delta \Delta \log(\tau/K_A) = \Delta \log(\tau/K_A)_{via\ de\ sinalização\ 1} - \Delta \log(\tau/K_A)_{via\ de\ sinalização\ 2} \quad [16]$$

1.11.4 Atividade Relativa Intrínseca (RA_i) baseada no Modelo Operacional.

É interessante notar que a RA_i pode também ser calculada usando-se o Modelo Operacional de Agonismo (Griffin *et al.*, 2007), podendo ser reescrita com a seguinte equação:

$$RA_i = \frac{(\tau_{agonista} / K_{A_{agonista}})}{(\tau_{referência} / K_{A_{referência}})} = \frac{\tau_{agonista} \times K_{A_{referência}}}{\tau_{referência} \times K_{A_{agonista}}} \quad [17]$$

Portanto o fator de tendência (β) (equação [12]) baseado na RA_i pode ser reescrito da seguinte maneira:

$$\beta = \log \left(\frac{((\tau/K_A)_{agonista} / (\tau/K_A)_{referência})_{via\ de\ sinalização\ 1}}{((\tau/K_A)_{agonista} / (\tau/K_A)_{referência})_{via\ de\ sinalização\ 2}} \right) \quad [18]$$

$$\beta = (\log(\tau/K_A)_{agonista} - \log(\tau/K_A)_{referência})_{via\ de\ sinalização\ 1} - (\log(\tau/K_A)_{agonista} - \log(\tau/K_A)_{referência})_{via\ de\ sinalização\ 2} \quad [19]$$

Dessa maneira, pode-se perceber que a equação que descreve o fator de tendência (β) (equação [19]) é similar a equação [16] que calcula o fator de tendência ($\Delta \log(\tau/K_A)$) proposto por Kenakin e colaboradores (Kenakin *et al.*, 2012; Tschammer *et al.*, 2011).

1.12 Evidências de agonismo tendencioso em α_1 -adrenoceptores

A seletividade funcional de agonistas das classes das feniletilaminas e imidazolininas em duas vias de sinalização por proteínas G diferentes (G_q e G_s) e na acidificação extracelular, um ensaio que reflete a atividade celular total, foi recentemente descrita em células CHO expressando α_{1A} -adrenoceptores humanos (Evans *et al.*, 2011). Entretanto, não há estudos comparando se agonistas de α_1 -adrenoceptores apresentam agonismo tendencioso para a sinalização da proteína G_q ou da β -arrestina. Portanto, há necessidade de estudos comparativos que determinem as eficácias colaterais dos agonistas nos α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores em vias de sinalização dependentes de proteína G_q ou de β -arrestina.

Objetivo

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral:

Investigar se agonistas de α_1 -adrenoceptores mais comumente utilizados das classes das feniletilaminas (noradrenalina, dopamina, fenilefrina e metoxamina) e imidazolinas (A61603, oximetazolina e nafazolina) apresentam agonismo tendencioso para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou internalização de α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes expressos em células HEK293.

2.2 Objetivos específicos:

- Quantificar o agonismo tendencioso α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores pela determinação das “razões de transdução” τ/K_A (Kenakin *et al.*, 2012; Tschammer *et al.*, 2011), e pelas razões das “eficiências de acoplamento” τ (Rajagopal *et al.*, 2011) e comparar a tendência estimada por cada um destes métodos.
- Investigar repercussões funcionais do agonismo tendencioso em α_1 -adrenoceptores.
- Comparar as “eficácias” de agonistas de α_1 -adrenoceptores em receptores humanos recombinantes e nativos do rato.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1 Cultura de Células HEK293

Células derivadas do rim embrionário humano (HEK293) foram mantidas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) com 1 mM piruvato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), 10 mg/l de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina a 37° C em atmosfera umidificada (5% CO₂). Placas de 100 mm confluentes foram subcultivadas (divididas) numa razão de 1:3. Cada divisão foi considerada uma "passagem".

3.2 Vetores e Amplificação de DNA plasmidial por Maxiprep

Os vetores pDT contendo a sequência que codifica os α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores humanos marcados com hexahistidina (HHHHHH) e Flag (DYKDDDDK) na porção N-terminal (Vicentic *et al.*, 2002); (Pupo e Minneman, 2003) foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Kenneth P. Minneman (King Abdullah University of Science and Technology, Arábia Saudita).

Bactérias *E.coli* DH5 α competentes foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos de interesse. Após o crescimento das bactérias transformadas em meio LB com antibiótico apropriado (ampicilina) foi realizado a colheita e lise das bactérias e a purificação do DNA plasmidial em larga escala por Maxiprep (HiSpeed Plasmid Maxi kit, Qiagen). A concentração de DNA plasmidial extraída foi determinada por absorbância a 260 nm e adicionalmente a razão 260/280 foi utilizada para determinar a pureza do DNA em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific).

3.3 Transfecções

Para os ensaios de mobilização de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e de internalização, as células HEK293 foram transfectadas por Lipofectamina® (Invitrogen) com os vetores pDT contendo a sequência que codifica os α_{1A} -adrenoceptores (20 μg) ou α_{1B} -adrenoceptores (24 μg) humanos marcados com hexahistidina (HHHHHH) e Flag (DYKDDDDK) em sua porção N-terminal e células estavelmente transfectadas foram selecionadas com 400 (α_{1B} -adrenoceptores) a 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (α_{1A} -adrenoceptores) de geneticina (G-418) e utilizados até a décima passagem.

3.4 Preparação de Membrana das células HEK293

Para a preparação de membranas, as células HEK293 expressando estavelmente os α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores foram coletadas em solução salina gelada tamponada com fosfatos (20 mM NaPO_4 , 154 mM NaCl, pH 7.6), homogeneizadas com Ultra-Turrax, centrifugados a 30000 x g, 4°C por 20 min, e ressuspensas em tampão A (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Esse procedimento foi repetido e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford usando albumina bovina como padrão (Bradford, 1976). A preparação de membrana foi ressuspensa numa concentração de 1 mg de proteína/ml de tampão A e utilizadas imediatamente ou armazenadas em freezer – 80°C para utilização posterior.

3.5 Ensaio de ligação com o radioligante [^3H]prazosin em preparações de membrana de células HEK293

As eficiências das transfecções das células HEK293 com os vetores pDT contendo a sequência que codificam os α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores humanos foram determinadas através da quantificação dos sítios de ligação específica por análise da saturação da ligação do radioligante [^3H]prazosin em preparações de membrana destas células. Para os experimentos de saturação da ligação específica do radioligante seletivo de α_1 -adrenoceptores [^3H]prazosin, foi preparada uma solução estoque de proteínas dividida em duas partes. Uma, para a ligação total, e a outra para ligação não-específica, a qual foi determinada na presença de fentolamina 100 μM . Alíquotas de proteínas foram então distribuídas nos tubos de ensaio (100 μl), e em seguida foram colocadas as diferentes concentrações de [^3H]prazosin (20-2000 pM) em 100 μl de PBS, obtendo assim, um volume final de 200 μl em cada tubo. Os tubos foram incubados a 25°C durante 60 minutos. O [^3H]prazosin ligado foi separado daquele livre por filtração a vácuo em membrana de fibra de vidro (Whatman GF/C) pré-encharcada com 0.1% de solução BSA (por 30 minutos) utilizando-se um coletor de células Brandell acoplado à bomba de vácuo. Os filtros foram lavados com aproximadamente 4 ml de tampão Tris-HCl (pH 7.4) gelado. As membranas de fibra de vidro foram secas por duas horas e então transferidas para frascos aos quais foram adicionados 4 ml de líquido de cintilação (OptiPhase “HiSafe” 3, PerkinElmer) e homogeneizados em vortex. Foram esperados no mínimo 30 minutos antes da leitura. A radioatividade contida nas membranas de fibra de vidro foi quantificada em um contador de cintilação (Liquid Scintillation Analyzer – 1900 TR – Packard, PerkinElmer). Estes experimentos de saturação permitiram estimar a capacidade máxima de ligação (B_{MAX} , densidade de

sítios de ligação/mg de proteína) e o K_D que reflete a afinidade do radioligante pelo receptor através da análise de regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

As afinidades dos agonistas de α_1 -adrenoceptores (as feniletilaminas (noradrenalina, fenilefrina, metoxamina e dopamina), imidazolinas (A61603, oximetazolina e nafazolina) foram determinadas através da análise da competição dessas drogas por sítios de ligação específica do radioligante [^{3} H]prazosin em preparações de membrana das células HEK293. Para realização dos ensaios de competição pela ligação do radioligante pelos agonistas de α_1 -adrenoceptores foram utilizados tubos de ensaio contendo preparações de membrana (10 μ g de proteína) em 50 μ l de PBS. Foram então adicionados 50 μ l de concentrações crescentes do agonista a ser testado. Após 5 minutos, foi adicionado 100 μ l da concentração de [^{3} H]prazosin semelhante ao seu valor de K_D obtido nos ensaios de saturação para cada subtipo de α_1 -adrenoceptores, de tal forma que se obtivesse um volume final de 200 μ l em cada tubo. Para determinar a ligação total, em um tubo adicionou-se a preparação de membrana e o [^{3} H]prazosin e para a ligação não-específica, em um tubo adicionou-se a proteína e o [^{3} H]prazosin na presença de fentolamina (100 μ M). Os tubos foram incubados a 25°C durante 60 minutos.

Todos os experimentos com o radioligante [^{3} H]prazosin foram realizados em duplicata em preparações de membrana de células HEK293 expressando os α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores.

Os experimentos de competição permitiram estimar a constante de dissociação no equilíbrio (K_i) de cada agonista, calculada através da equação de Cheng-Prusoff (Cheng e Prusoff, 1973):

$$K_I = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \left(\frac{[Radioligante]}{K_D}\right)\right)} \quad [20]$$

onde, o IC_{50} é a concentração molar da droga não-marcada que inibe a ligação do radioligante em 50%, $[Radioligante]$ é a concentração molar da droga radioativa utilizada e o K_D é a constante de dissociação no equilíbrio do radioligante. Todos os dados dos experimentos de competição da ligação específica do radioligante [^3H]prazosin foram analisados por regressão não-linear pelo software GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

3.6 Mobilização de concentrações intracelulares de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) induzida por agonistas de α_1 -adrenoceptores

Os ensaios para detecção de $[Ca^{2+}]_i$ se baseiam na utilização do indicador fluorescente de Ca^{2+} FLUO-4 NW (Invitrogen) que após ser incorporado pela célula sofre clivagem dos grupos acetoximetil por esterases intracelulares se tornando um fluoróforo ativo e sensível a aumentos nos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ (Gee *et al.*, 2000). Células HEK293 expressando os α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores (30 mil células/poço) em 100 μ l de meio DMEM suplementado com 10% SFB e estreptomicina/penicilina foram cultivadas em placas de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente (ViewPlate-96, PerkinElmer) pré-tratadas com poli-D-lisina, *overnight*. O meio DMEM foi então removido e as células lavadas com PBS sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} (200 μ l de PBS (8g/l NaCl; 0.2g/l KCl; 0.2g/l KH_2PO_4 ; 2.16g/l

Na₂HPO₄·7H₂O). As células foram incubadas com 100 µl do indicador fluorescente de Ca²⁺ FLUO-4 NW (Invitrogen) reconstituído em tampão HBSS (8g/l NaCl; 0.4g/l KCl; 0.14g/l CaCl₂; 0.1 MgCl₂·6H₂O; 0.1g/l MgSO₄·7H₂O; 0.06g/l KH₂PO₄; 2.16g/l; 0.35g/l NaHCO₃; 0.048g/l Na₂HPO₄; 1g/l glicose) com 20mM HEPES e adicionado probenecida 2.5 mM por 1h15 min a 37°C. A probenecida solúvel em água, um inibidor do transportador de ânions orgânicos dependente de ATP, foi adicionada para inibir a extrusão do indicador fluorescente (Poot *et al.*, 1996). Células carregadas com este indicador fluorescente de Ca²⁺ não requerem lavagem para remoção de excesso de indicador não incorporado. Após a adição de 90µl de tampão HBSS com 20mM HEPES as placas foram inseridas no leitor de microplacas Synergy 4 (Biotek) e 10 µl dos agonistas de α₁-adrenoceptores foram adicionados aos poços por dispensadores para mensuração de fluorescência após excitação a 485 nm (filtro 485/20 nm) e emissão a 525 nm (filtro 516/20 nm). As medidas de fluorescência foram realizadas a cada 4 segundos, sendo que pelo menos três medidas foram realizadas para determinação da fluorescência basal e após a dispensação do agonista pelo menos onze medidas foram realizadas para a determinação do perfil da curva.

Adicionalmente, foram realizados ensaios para avaliar a capacidade da noradrenalina e oximetazolina promoverem taquifilaxia em células HEK293 expressando α_{1B}-adrenoceptores. As células foram cultivadas em placas de 96 poços paredes pretas e fundo transparente (ViewPlate-96, PerkinElmer) (30 mil células/poço) num volume de 100 µl, *overnight*. O meio DMEM foi então removido e as células lavadas com PBS sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺ e estimuladas com noradrenalina, oximetazolina ou veículo (Tris base 50mM, pH 7,4) pelo tempo desejado. As células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com 100 µl do

indicador fluorescente de Ca^{2+} FLUO-4 NW contendo probenecida 2.5 mM por 1h15 min a 37°C. As etapas seguintes são as mesmas dos ensaios descritos anteriormente.

Os dados obtidos nos ensaios cinéticos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram apresentados como $(\text{Fluorescência máxima} - \text{Fluorescência basal})/\text{Fluorescência basal}$ e as curvas concentração-resposta foram normalizadas como porcentagem da resposta máxima induzida pelo agonista de referência noradrenalina.

3.7 Internalização dos α_{1A} - ou α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293 induzido por agonistas de α_1 -adrenoceptores

A internalização dos α_1 -adrenoceptores de superfície celular foi quantificada por quimiluminescência do anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 conjugado à peroxidase. Células HEK293 transfectadas estavelmente com α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores humanos marcados com epítipo FLAG na porção N-terminal foram cultivadas em placas de 96 poços de paredes brancas (CulturPlate-96, Perkin Elmer) pré-tratadas com poli-D-lisina, a uma densidade de 30 mil células/poço num volume de 100 μl de meio DMEM suplementado com 10% SFB e estreptomicina/penicilina, *overnight*. No momento do experimento, as células foram lavadas com 200 μl de PBS e tratadas com 100 μl dos agonistas de α_1 -adrenoceptores diluídos em Tris base 50 mM, pH 7,4 por diferentes períodos à 37°C. Após a estimulação, as células foram lavadas 2 vezes com 200 μl de PBS e então fixadas com 100 μl de paraformaldeído 4% em PBS gelado por 20 min à temperatura ambiente. A seguir as células foram lavadas 5 vezes com 200 μl de PBS por 5 min sob agitação suave e incubadas com 200 μl de tampão de bloqueio (2% leite

desnatado em PBS, pH 7.4) por 30 min e incubadas por 90 min sob agitação suave à temperatura ambiente com anticorpos anti-FLAG M2 conjugados à peroxidase (diluição 1:1000), o qual reconhece o epítopo FLAG presente na porção N-terminal do α_1 -adrenoceptor. Ao final da incubação com o anticorpo, as placas foram lavadas 5 vezes com 200 μ l de PBS por 5 min sob agitação suave. As células foram incubadas com reagente quimiluminescente ECL (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) por 15 segundos e imediatamente inseridas no leitor de microplacas Synergy 4 (Biotek) para mensuração de luminescência (filtro de emissão: 460/40), a qual está relacionada aos receptores localizados na superfície celular.

Os dados dos experimentos de internalização de receptores de superfície foram normalizados considerando-se como 0% de internalização o sinal proveniente de células HEK293 transfectadas com os α_1 -adrenoceptores mas não estimuladas com os agonistas, e a internalização máxima (ou 100% de internalização) foi considerada como o sinal obtido com as células HEK293 não transfectadas, cuja luminescência reflete a ligação do anticorpo Anti-FLAG M2 à antígenos inespecíficos.

3.8 Análise do agonismo tendencioso

Foram utilizados diferentes métodos para a análise do agonismo tendencioso, os quais serão revistos a seguir.

3.8.1 Análise qualitativa do agonismo tendencioso

Para a comparação equimolar, dados de um único agonista em dois ensaios diferentes (mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização) nas mesmas

concentrações foram colocados um contra o outro para criar um gráfico de tendência (*bias plot*) (Kenakin *et al.*, 2012; Rajagopal *et al.*, 2011).

3.8.2 Análise quantitativa do agonismo tendencioso (Modelo Operacional)

Para quantificar o agonismo tendencioso, os efeitos dos agonistas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e na internalização foram ajustados ao Modelo Operacional de Agonismo (Black e Leff, 1983), de acordo com a equação [8] descrita na Introdução desta tese.

3.8.2.1 Razões de τ

O método proposto por Lefkowitz e colaboradores (Rajagopal *et al.*, 2011) é baseado em razões de “eficiências de acoplamento” (τ). Esses valores de τ foram obtidos pela equação do Modelo Operacional, mas os valores de K_A dos agonistas foram substituídos pelos valores de K_I obtidos nos ensaios de competição da ligação específica do radioligante $[^3H]$ prazosin, tal como recomendado (Rajagopal *et al.*, 2011). A sinalização efetiva (σ) foi determinada segundo a equação [13] descrita na Introdução desta tese. O fator de tendência β foi calculado como a diferença dos fatores de sinalização efetiva, segundo a equação [14] da Introdução desta tese.

3.8.2.1 Razões de τ/K_A

O método proposto por Kenakin e colaboradores (Kenakin *et al.*, 2012; Tschammer *et al.*, 2011) é baseado em comparações de razões τ/K_A entre agonistas, onde os valores de $\log(\tau/K_A)$ foram calculados através de uma reparametrização da equação do modelo operacional (Evans *et al.*, 2011):

$$Resposta = basal + \frac{(E_{max} - basal) \times TR^n \times [A]^n}{[A]^n \times TR^n \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^n} \quad [21]$$

onde E_{max} é a resposta máxima do sistema, $basal$ é o sinal medido na ausência do agonista, K_A é a constante de dissociação no equilíbrio, n é a inclinação de transdução e o TR (*transduction ratio* ou razão de transdução) é a razão τ/K_A .

Os valores de $\Delta \log(\tau/K_A)$ foram calculados de acordo com a equação [15] e o fator de tendência $\Delta \log(\tau/K_A)$ foi calculado de acordo com a equação [16], que foram descritas na Introdução desta tese.

Um tutorial sobre a aplicação do Modelo Operacional de Agonismo e a determinação dos fatores de tendência é apresentado no Apêndice A desta tese.

3.9 Experimentos de contração de músculos lisos de rato

As eficácias dos agonistas foram determinadas em experimentos de contração do ducto deferente de rato (respostas mediadas pela ativação de α_{1A} -adrenoceptores) e baço de rato (respostas mediadas pela ativação de α_{1B} -adrenoceptores) (Burt *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2005).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso Animais de Experimentação da UNESP – Botucatu (protocolo nº 031/05-CEEA). Ratos Wistar machos adultos (16 a 20 semanas de idade, 260 a 380g) foram decapitados em guilhotina e os tecidos selecionados foram cuidadosamente retirados e preparados para o registro digital de contrações isométricas como se segue: o ducto deferente (porção epididimal), baço (hemi-seções) foram limpos de tecidos aderentes e montados em câmaras musculares de 10 ml sob tensão ótima

de 9.8 mN em solução nutriente com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5.7, CaCl_2 1.8, NaH_2PO_4 0.36, NaHCO_3 15, dextrose 5.5, (para o ducto deferente); NaCl 119, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, dextrose 5.5, (para baço) preparada em água destilada e deionizada e mantida a 30°C (ducto deferente) ou 37°C (baço), pH 7.4, continuamente borbulhada com mistura de 95% O_2 /5% CO_2 . Todos os experimentos foram feitos na presença de um coquetel de inibidores contendo cocaína (6 μM), corticosterona (10 μM), ioimbina ou idazoxan (1 μM) e propranolol (0.1 μM) para bloquear a captação neuronal, extraneuronal, e α_2 - e β -adrenoceptores, respectivamente (Lima *et al.*, 2005). Curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas pela adição de concentrações crescentes dos agonistas (Besse e Furchgott, 1976).

3.9.1 Modelo operacional aplicado aos ensaios de contração

O coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ obtida nos ensaios de mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de internalização obtidas nos células HEK293 expressando estavelmente os α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes foram comparados ao $\log(\tau/K_A)$ obtido nos ensaios de contração do ducto deferente de rato que expressam nativamente os α_{1A} -adrenoceptores e do baço de rato que expressam nativamente os α_{1B} -adrenoceptores.

Para obtenção da razão $\log(\tau/K_A)$, onde $\log(\tau/K_A) = \log \tau - \log K_A$, os dados obtidos em ensaios de contração foram submetidos ao Modelo Operacional (Black e Leff, 1983). Para os ligantes testados que se comportaram como agonistas totais nos ensaios de contração do ducto deferente e do baço de rato, o $\log \tau$ e o $\log K_A$ de cada agonista total foram calculados pelo método de depleção de receptores. Tal método baseia-se na comparação curvas concentração-resposta de um agonista

total antes e após a alquilação parcial dos receptores. Assim, os agonistas totais foram comparados antes e após o tratamento com fenoxibenzamina 10 nM por 15 minutos para ducto deferente de rato e fenoxibenzamina 10 μ M por 30 minutos. Para os agonistas testados que se comportaram como agonistas parciais, suas curvas concentração-resposta foram comparadas ao agonista total de referência, a noradrenalina para a obtenção dos $\log \tau$ e $\log K_A$.

Os dados de agonistas totais obtidos nos ensaios de contração foram analisados por regressão não-linear pelo software GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

3.10. Drogas e reagentes

CaCl₂; KCl; KH₂PO₄; MgCl₂; MgSO₄; NaCl; Na₂HPO₄; NaHCO₃; NaOH; NaPO₄: Merck (Brasil); A61603 hydrobromide: N-[5-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)-2-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl]methanesulfonamide), Tocris (E.U.A); Ácido fosfórico, Dinâmica (Brasil); Ampicilina: Ampicillin Trihydrate, USB (E.U.A); Azul de coomassie: Coomassie brilliant blue G-250, Amresco (E.U.A); Cocaína: Cocainum Hydrochloricum puriss., C.H. Boehringer Sohn; Cortisona: Cortisone acetate, Cruz Vermelha (Brasil); DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, Cultilab (Brasil); DMSO: Dimethyl Sulfoxide, Sigma (E.U.A); Dopamina: Dopamine hydrochloride, Sigma-Aldrich (E.U.A.); EDTA: EDTA di-Sodium Salt, Biosolve, Países Baixos; Etanol: Álcool etílico, Dinâmica (Brasil); ECL: Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific (E.U.A); Estreptomicina/Penicilina, Sigma (E.U.A.); Fenilefrina: Phenylephrine hydrochloride, RBI (E.U.A); Fentolamina: Phentolamine mesylate, RBI (E.U.A); Geneticina: Geneticin (G418 Sulfate), Invitrogen (E.U.A); HEPES: HEPES free acid, Biosolve (Países Baixos); HiSpeed Plasmid Maxi kit,

Qiagen (E.U.A); Idazoxan: Idazoxan HCl, Sigma-Aldrich (E.U.A.); Lipofectamina[®]: Lipofectamin[™] 2000 Transfection Reagent, Invitrogen (E.U.A.); Líquido de cintilação: Liquid Scintillation Cocktail OptiPhase “HiSafe” 3, PerkinElmer (E.U.A); Metoxamina: Methoxamine hydrochloride, Sigma (E.U.A); Nafazolina: Naphazoline HCl, Cruz Vermelha (Brasil);] Noradrenalina: (-)-Norepinephrine(+)- bitartrate salt hydrate, Sigma-Aldrich (E.U.A); Oximetazolina: Oxymetazoline hydrochloride, RBI (E.U.A); Paraformaldeído (PFA): Paraformaldehyde, Sigma (E.U.A.); poli-L-lisina: poly-L-lysine solution, Sigma (E.U.A); Prazosin: Prazosin Hydrochloride, RBI (E.U.A); [³H]-prazosin: [7-methoxy-³H]Prazosin, GE Healthcare (E.U.A.); Propranolol: (dl)-Propranolol hydrochloride, RBI (E.U.A); Soro fetal bovino, Sigma (E.U.A.).

3.11. Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm) de 3 a 4 experimentos. Diferenças entre valores médios foram investigadas pelo teste *t* de *Student* pareado ou não, ou ANOVA seguida de Newman-Keuls ou Dunnett para comparações múltiplas usando o programa GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

Resultados

4. Resultados

4.1 Expressão dos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores em células

HEK293

A caracterização farmacológica dos α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores expressados estavelmente em células HEK293 foi feita por ensaios de saturação e de competição da ligação específica do radioligante [^{3} H]prazosin. Não houve ligação específica do [^{3} H]prazosin em preparações de membrana de células HEK293 não transfectadas, indicando que estas células não possuem α_1 -adrenoceptores endógenos.

A Figura 13 mostra curvas de saturação da ligação específica do radioligante [^{3} H]prazosin em preparação de membrana de células HEK293 expressando estavelmente α_{1A} -adrenoceptores (Figura 13A) e α_{1B} -adrenoceptores (Figura 13B). A análise da saturação da ligação específica do [^{3} H]prazosin resultou em B_{MAX} (densidade expressa como fmol/mg de proteína) e K_D (pM) para α_{1A} -adrenoceptores 2750 ± 102.8 e 584.5 ± 55.41 e para α_{1B} -adrenoceptores 2753 ± 124.7 e 651.2 ± 72.35 , respectivamente.

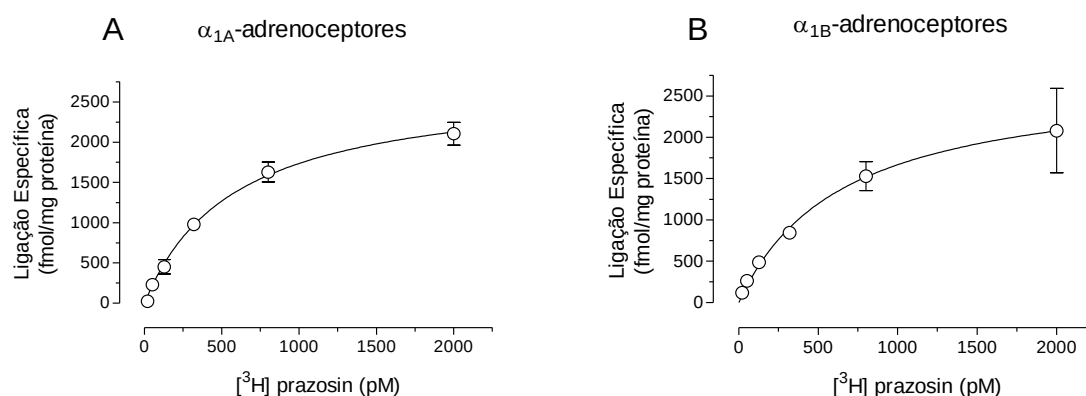


Figura 13. Curvas de saturação de ligação específica do [^{3} H]prazosin em preparação de membrana de células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores. Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, e.p.m. de 3 experimentos.

As constantes de dissociação (K_D) estimadas para o [^{3} H]prazosin em preparações de membranas células HEK293 transfectadas com os plasmídeos pDT codificando α_{1A} - ou α_{1B} -adrenoceptores são condizentes com aquelas esperadas para a ligação do radioligante em α_1 -adrenoceptores (Arcos *et al.*, 2003; Arias-Montano *et al.*, 1999).

As estimativas de afinidade (pK_i) das feniletilaminas e imidazolininas em ensaios de competição pela ligação específica do [^{3} H]prazosin às preparações de membrana de células HEK293 transfectadas com α_{1A} -adrenoceptores ou α_{1B} -adrenoceptores são mostrados na Tabela 1. Estes valores foram utilizados no Modelo Operacional para o cálculo posterior do “fator de tendência” β segundo Rajagopal *et al.* (2011). Notar que as feniletilaminas fenilefrina e metoxamina e as imidazolininas A61603, oximetazolina e nafazolina mostraram seletividade por α_{1A} -adrenoceptores.

Tabela 1. Afinidades (pK_i) dos agonistas de α_1 -adrenoceptores em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes obtidas em ensaios de competição pela ligação específica do radioligante [^{3} H]prazosin.

	α_{1A} -adrenoceptores	α_{1B} -adrenoceptores
Noradrenalina	5.1 ± 0.1	4.7 ± 0.1
Dopamina	3.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1
Fenilefrina	5.2 ± 0.1	3.8 ± 0.3
Metoxamina	4.6 ± 0.4	3.0 ± 0.1
A61603	7.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1
Oximetazolina	6.8 ± 0.2	5.2 ± 0.1
Nafazolina	6.6 ± 0.3	5.9 ± 0.1

Valores foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 4 experimentos. Os coeficientes de Hill (*Hill slope*) das curvas de inibição não diferiram da unidade teórica prevista para a competição por um único sítio de ligação, bem como os melhores ajustes das curvas de inibição foram encontrados nas análises de competição por um sítio em comparação às de dois sítios.

4.2 Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ induzida por agonistas de α_1 -adrenoceptores

Para ilustração, a Figura 14 mostra um ensaio cinético típico de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ após a administração de noradrenalina (3 nM a 10 μ M) a células HEK293 expressando estavelmente α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes. A mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ após administração de noradrenalina foi rápida e concentração-dependente. Tal perfil de resposta também foi encontrado em células HEK293 expressando estavelmente α_{1A} -adrenoceptores, mas não em células HEK293 não transfectadas, onde a noradrenalina não induziu mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ indicando que estas células não possuem α_1 -adrenoceptores endógenos funcionais.

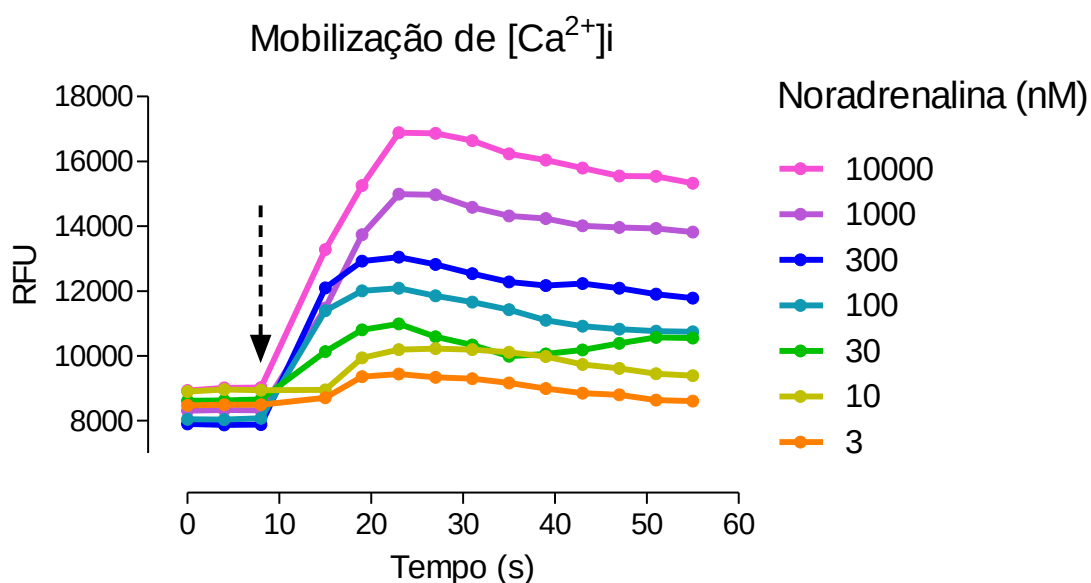


Figura 14. Ensaio cinético típico de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ após estimulação de células HEK293 expressando estavelmente α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes com noradrenalina (3 nM a 10 μ M). A seta indica o momento da administração de noradrenalina.

A Figura 15 mostra curvas concentração-resposta para mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 (30 mil células/poço) expressando α_1 -adrenoceptores humanos recombinantes estimuladas com as feniletilaminas noradrenalina, dopamina fenilefrina e metoxamina (Figura 15A, para os α_{1A} -adrenoceptores e Figura 15B para os α_{1B} -adrenoceptores) e as imidazolinas A61603, oximetazolina e nafazolina (Figura 15C, para os α_{1A} -adrenoceptores e Figura 15D para os α_{1B} -adrenoceptores). Todos os agonistas mobilizaram $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando os α_{1A} -adrenoceptores (Figuras 15A e 15C) e as feniletilaminas dopamina, fenilefrina e metoxamina e a imidazolina A61603 foram agonistas totais em relação à noradrenalina, enquanto que as imidazolinas oximetazolina e nafazolina foram agonistas parciais (Tabela 2). Contudo, em células HEK293 expressando os α_{1B} -adrenoceptores, nenhuma das imidazolinas mobilizou $[Ca^{2+}]_i$

(Figura 15D), mas as feniletilaminas dopamina e fenilefrina foram agonistas totais e a metoxamina foi um agonista parcial em relação à noradrenalina (Figura 15B, Tabela 2). As ordens de potência das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores são mostradas abaixo da Tabela 2.

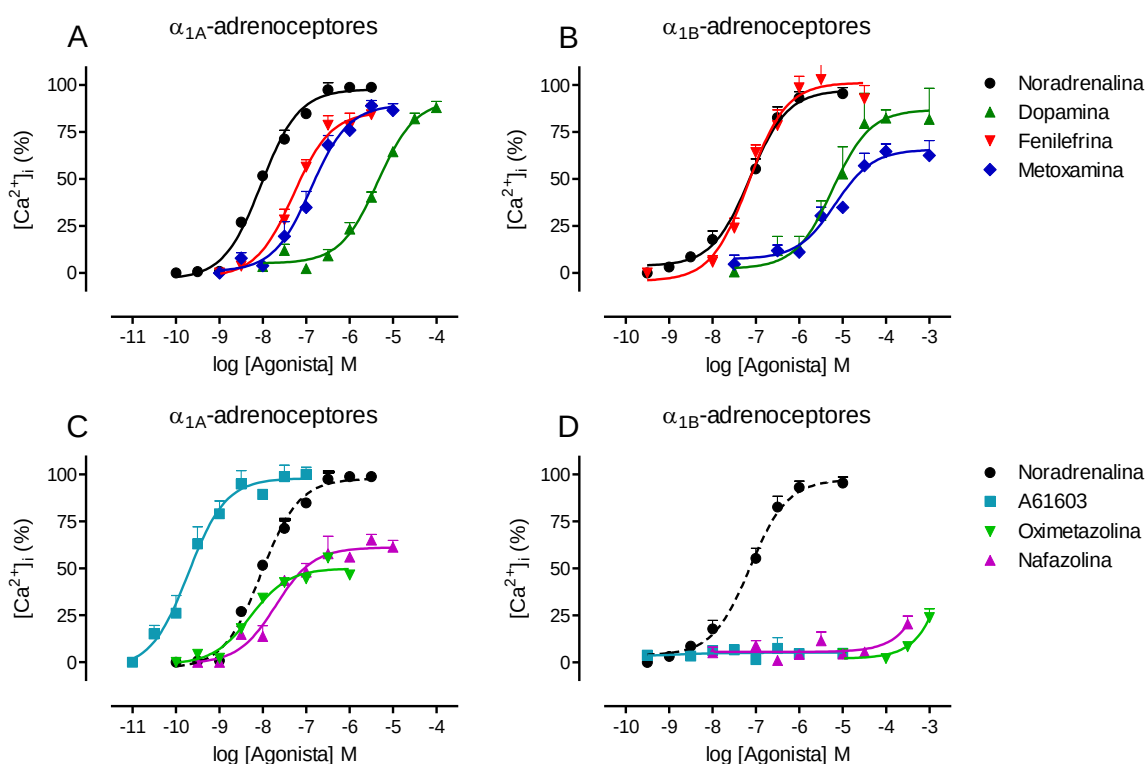


Figura 15. Curvas concentração-resposta para as feniletilaminas (A e B) e imidazolininas (C e D) na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando os α_{1A} -adrenoceptores (A e C) ou α_{1B} -adrenoceptores (B e D), (30 mil células/poço em placa de 96 poços). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos independentes. Os dados foram normalizados para as respostas máximas da noradrenalina.

Tabela 2. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para agonistas de α_1 -adrenoceptores nos ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

		α_{1A} -adrenoceptores	α_{1B} -adrenoceptores
Noradrenalina	pEC_{50}	8.03 ± 0.04	7.14 ± 0.09
	E_{max}	97.8 ± 1.7	97.3 ± 2.8
	α	1.00	1.00
Dopamina	pEC_{50}	5.35 ± 0.06	5.23 ± 0.20
	E_{max}	92.0 ± 3.1	90.0 ± 7.3
	α	0.94	0.89
Fenilefrina	pEC_{50}	7.29 ± 0.10	7.16 ± 0.11
	E_{max}	85.8 ± 3.4	101.3 ± 4.0
	α	0.88	1.04
Metoxamina	pEC_{50}	6.89 ± 0.09	5.17 ± 0.17
	E_{max}	89.6 ± 3.5	65.8 ± 3.8
	α	0.92	0.68
A61603	pEC_{50}	9.71 ± 0.13	n.d.
	E_{max}	97.9 ± 4.5	n.d.
	α	1.00	n.d.
Oximetazolina	pEC_{50}	8.28 ± 0.07	n.d.
	E_{max}	49.9 ± 1.3	n.d.
	α	0.51	n.d.
Nafazolina	pEC_{50}	7.70 ± 0.13	n.d.
	E_{max}	61.1 ± 2.9	n.d.
	α	0.63	n.d.

Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 4 experimentos independentes. O coeficiente de Hill (*Hill slope*) das curvas não diferiu da unidade teórica (1.0).

ORDEM DE POTÊNCIA (ANOVA seguida de Newman-Keuls $p < 0.05$):

α_{1A} -adrenoceptores: A61603^a > Oximetazolina^b $\cong$ Noradrenalina^b > Nafazolina^c > Fenilefrina^d > Metoxamina^e > Dopamina^f

α_{1B} -adrenoceptores: Fenilefrina^a $\cong$ Noradrenalina^a > Dopamina^b $\cong$ Metoxamina^b > A61603^c $\cong$ Oximetazolina^c $\cong$ Nafazolina^c

4.3 Internalização dos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores induzida por agonistas de α_1 -adrenoceptores

Na busca de otimização da ligação específica do anticorpo Anti-FLAG M2 conjugado à peroxidase, as densidades de células, as titulações e tempos de incubação do anticorpo, as condições de fixação das células com paraformaldeído e de lavagem dos anticorpos não ligados foram definidas em ensaios preliminares (dados não mostrados). Uma vez definidas estas condições (30 mil células/poço em placa de 96 poços, diluição do anticorpo 1:1000 e 90 minutos de incubação e 5 passos de lavagem sob agitação suave), o tempo de estimulação dos α_{1A} e α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293 necessário para a máxima internalização após a adição de noradrenalina foi determinado. O curso temporal da internalização de α_{1A} e α_{1B} -adrenoceptores induzida pela noradrenalina (10 ou 100 μ M) é mostrado na (Figura 16). Os α_{1B} -adrenoceptores foram internalizados mais rapidamente que os α_{1A} -adrenoceptores após a adição de noradrenalina, e enquanto a internalização máxima dos α_{1B} -adrenoceptores foi observada após ~30 min, a dos α_{1A} -adrenoceptores foi observada após ~50 min. Para a construção de curvas concentração-resposta foi escolhido o tempo de 60 min.

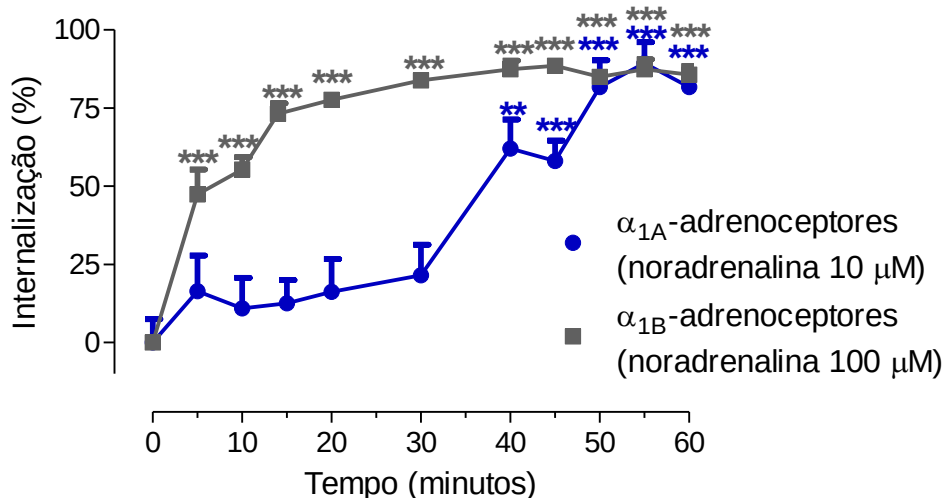


Figura 16. Curso temporal da internalização de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores induzida pela noradrenalina (10 ou 100 μ M) em células HEK293 transfectadas com α_{1A} - ou α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes (30mil células/poço em placa de 96 poços). A luminescência foi detectada após a incubação e lavagem de anticorpos anti-FLAG M2 conjugados à peroxidase (1:1000). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos. Os asteriscos representam diferenças significativas dos tratamentos temporais em relação ao controle no tempo zero (ANOVA seguida de Dunnett, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

A Figura 17 mostra curvas concentração-resposta para a internalização dos α_1 -adrenoceptores humanos recombinantes expressos em células HEK293 após a estimulação por 60 min com as feniletilaminas noradrenalina, dopamina fenilefrina e metoxamina (Figura 17A, para os α_{1A} -adrenoceptores e Figura 17B para os α_{1B} -adrenoceptores) e as imidazolininas A61603, oximetazolina e nafazolina (Figura 17C, para os α_{1A} -adrenoceptores e Figura 17D para os α_{1B} -adrenoceptores).

Todos os agonistas internalizaram α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes estavelmente expressos em células HEK293 (Figura 17, Tabela 3). As feniletilaminas e imidazolininas investigadas se comportaram como agonistas totais

na internalização dos α_{1A} -adrenoceptores em relação à noradrenalina. Contudo, as imidazolininas oximetazolina e nafazolina foram agonistas parciais em relação à noradrenalina na internalização dos α_{1B} -adrenoceptores (Figura 17, Tabela 3). As ordens de potências das feniletilaminas e imidazolininas na internalização dos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores são mostradas abaixo da Tabela 3. É importante observar que as feniletilaminas e imidazolininas não apresentaram a mesma ordem de potência na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ (Tabela 2) e na internalização (Tabela 3). Isso é um forte indício de que há ligantes que apresentam agonismo tendencioso nos subtipos α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores.

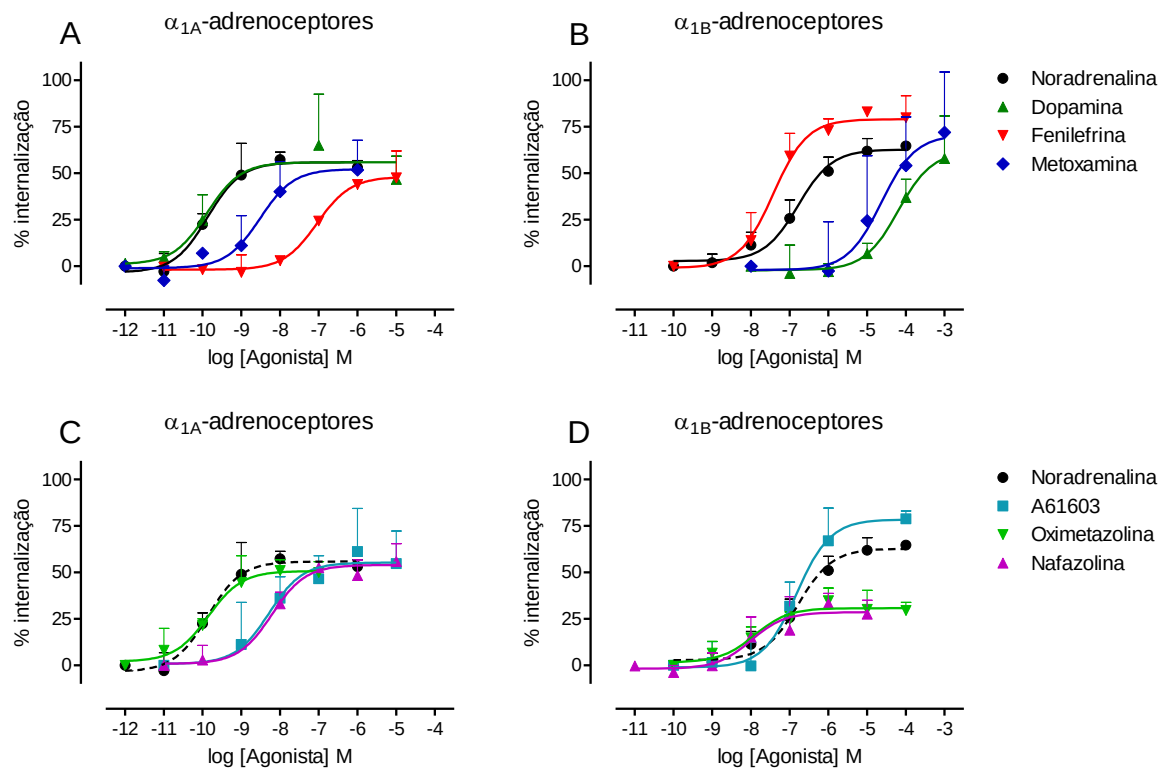


Figura 17. Curvas concentração-resposta das feniletilaminas (A e B) e imidazolininas (C e D) para internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A e C) ou α_{1B} -adrenoceptores (B e D) humanos recombinantes expressos em células HEK293 (30mil células/poço em placa de 96 poços). A luminescência foi detectada após a incubação e lavagem de anticorpos anti-FLAG M2 conjugados à peroxidase (1:1000). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos.

Tabela 3. Potência (pEC_{50}), internalização máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para agonistas de α_1 -adrenoceptores para os ensaios de internalização em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

		α_{1A} -adrenoceptores	α_{1B} -adrenoceptores
Noradrenalina	pEC_{50}	9.86 ± 0.30	6.80 ± 0.16
	E_{max}	55.1 ± 5.5	64.4 ± 3.5
	α	1.00	1.00
Dopamina	pEC_{50}	9.88 ± 0.48	4.20 ± 0.48
	E_{max}	55.9 ± 9.9	61.8 ± 13.8
	α	1.01	0.96
Fenilefrina	pEC_{50}	7.04 ± 0.41	7.42 ± 0.26
	E_{max}	48.1 ± 7.3	79.1 ± 5.9
	α	0.87	1.23
Metoxamina	pEC_{50}	8.52 ± 0.52	4.63 ± 0.88
	E_{max}	52.3 ± 13.1	70.5 ± 27.0
	α	0.95	1.10
A61603	pEC_{50}	8.28 ± 0.57	6.82 ± 0.27
	E_{max}	55.3 ± 9.0	78.5 ± 8.8
	α	1.00	1.22
Oximetazolina	pEC_{50}	9.85 ± 0.35	7.91 ± 0.35
	E_{max}	50.8 ± 5.9	30.8 ± 2.9
	α	0.92	0.48
Nafazolina	pEC_{50}	8.20 ± 0.30	8.00 ± 0.52
	E_{max}	54.0 ± 4.2	28.6 ± 5.2
	α	0.98	0.44

Valores são apresentados como media $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 4 experimentos. O coeficiente de Hill (*Hill slope*) das curvas não diferiu da unidade teórica (1.0).

Ordem de potência (ANOVA seguida de Newman-Keuls ($p < 0.05$)):

α_{1A} -adrenoceptores: Dopamina^a $\cong$ Noradrenalina^a $\cong$ Oximetazolina^a > Metoxamina^b $\cong$ A61603^b $\cong$ Nafazolina^b > Fenilefrina^c

α_{1B} -adrenoceptores: Nafazolina^a $\cong$ Oximetazolina^a $\cong$ Fenilefrina^a > A61603^b $\cong$ Noradrenalina^b > Metoxamina^c $\cong$ Dopamina^c

4.4 Análise qualitativa do agonismo tendencioso

A comparação das curvas concentração-resposta para cada um dos agonistas utilizados das classes das feniletilaminas e das imidazolininas em dois ensaios diferentes, o de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e o de internalização para α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores podem ser vistas no Apêndice B. Essas curvas foram utilizadas para a comparação equimolar, onde os dados dos dois ensaios com um único agonista nas mesmas concentrações foram confrontados para criar um gráfico de tendência (*bias plot*) para α_{1A} -adrenoceptores (Figura 18A) e α_{1B} -adrenoceptores (Figura 18B).

Este gráfico mostra uma mistura de tendência do agonista e do sistema. A tendência de um sistema (*system bias*) se refere à quão bem acopladas as duas vias de sinalização estão em uma célula. (Kenakin, 2012). Isto é observado na curva do agonista de referência, o agonista endógeno noradrenalina que apresenta-se não como uma reta, mas inclinada em direção a uma das duas vias de sinalização (Figura 18). Embora seja simples, esta análise é meramente qualitativa, isto é, não é possível quantificar a tendência para uma ou outra via de sinalização.

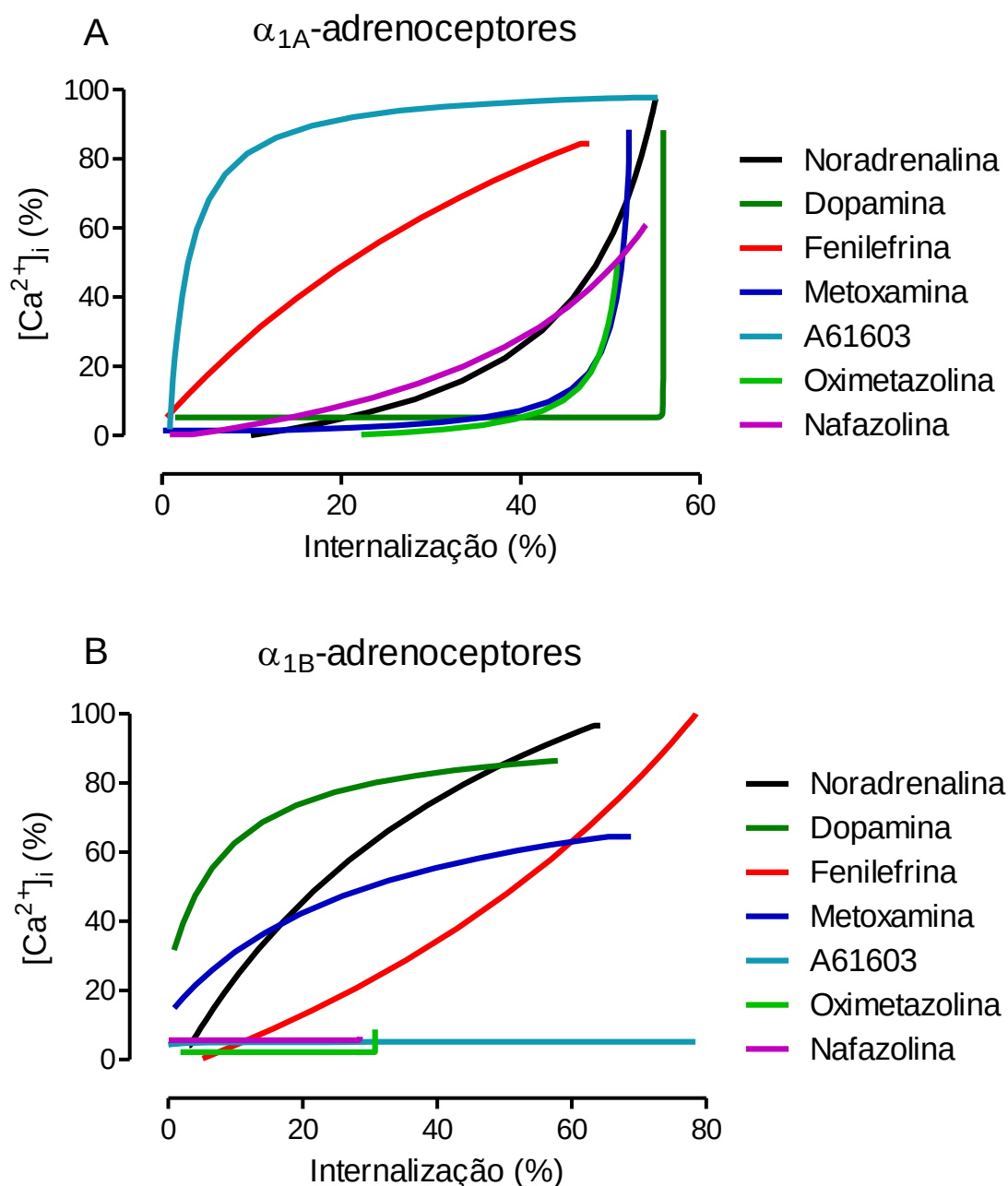


Figura 18. Gráfico de tendência (*bias plot*) para as feniletilaminas noradrenalina, dopamina, fenilefrina e, metoxamina e para as imidazolinas A61603, oximetazolina e nafazolina calculado através da comparação equimolar de um mesmo agonista em duas vias de sinalização diferentes. As curvas representam respostas para ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização mensurados em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B).

4.5 Análise quantitativa do agonismo tendencioso

A análise qualitativa apresentada anteriormente apontou agonismo tendencioso de feniletilaminas e imidazolinas em α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores. Entretanto, este tipo de análise apesar de ilustrativo não permite quantificação e por isso há a necessidade de utilizar-se de métodos quantitativos de análise de agonismo tendencioso.

4.5.1 Razões de τ

Para o cálculo dos valores de τ , os dados dos ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização foram analisados pelo Modelo Operacional de Agonismo de Black e Leff (segundo a equação [8] descrita na Introdução desta tese), porém usando os valores de K_i obtidos nos ensaios de competição da ligação específica do radioligante como estimativas de K_A , de acordo com o proposto por Lefkowitz e colaboradores (Rajagopal *et al.*, 2011). A razão entre $\tau_{agonista}$ e $\tau_{referência}$ mostrada na Tabela 4 foi utilizada para calcular a sinalização efetiva (σ) para ambas as vias, a qual é mostrada na Tabela 5. A sinalização efetiva (σ) de cada agonista na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e na internalização foi comparada à sinalização efetiva (σ) da noradrenalina, designada agonista de referência por ser um ligante endógeno dos α_1 -adrenoceptores (Figuras 19). O fator de tendência (β) foi calculado à partir das diferenças de sinalização efetivas (Tabela 5) e a expressão gráfica é mostrada na Figura 20.

Tabela 4. Valores de $\log \tau$ obtidos pelo modelo operacional (valores de K_i (obtidos em ensaios de ligação específica com radioligante) foram utilizados como valores de K_A) nos ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização para agonistas de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

	α_{1A} -adrenoceptores		α_{1B} -adrenoceptores	
	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$	Internalização	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$	Internalização
Noradrenalina	2.87 ± 0.07	4.77 ± 0.28	2.43 ± 0.09	1.75 ± 0.31
Dopamina	1.65 ± 0.08	6.23 ± 0.29	2.02 ± 0.15	0.71 ± 0.33
Fenilefrina	1.88 ± 0.08	1.65 ± 0.39	3.36 ± 0.16	3.59 ± 0.34
Metoxamina	2.17 ± 0.08	3.85 ± 0.30	2.16 ± 0.24	1.43 ± 0.31
A61603	2.17 ± 0.07	1.04 ± 0.31	n.d.	1.94 ± 0.33
Oximetazolina	0.43 ± 0.07	3.02 ± 0.28	n.d.	-0.02 ± 0.27
Nafazolina	0.47 ± 0.07	1.65 ± 0.42	n.d.	-0.09 ± 0.26

Valores de $\log \tau$ estão representados como a média $\pm$ epm dos agonista testados.

Tabela 5. Sinalização efetiva (σ) e Fator de tendência (β) ($[Ca^{2+}]_i$ -internalização) para agonistas de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

	α_{1A} -adrenoceptores			α_{1B} -adrenoceptores		
	Mobilização de [Ca ²⁺] _i	Internalização	Fator de tendência	Mobilização de [Ca ²⁺] _i	Internalização	Fator de tendência
	$\sigma_{Ca^{2+}}$	$\sigma_{Internalização}$	β	$\sigma_{Ca^{2+}}$	$\sigma_{Internalização}$	β
Noradrenalina	0.00 ± 0.09	0.00 ± 0.39	0.00 ± 0.40	0.00 ± 0.13	0.00 ± 0.43	0.00 ± 0.45
Dopamina	-1.22 ± 0.10	1.46 ± 0.40	-1.90 ± 0.41*	-0.41 ± 0.17	-1.04 ± 0.45	0.45 ± 0.48
Fenilefrina	-0.99 ± 0.11	-3.13 ± 0.48	1.50 ± 0.49*	0.93 ± 0.18	1.84 ± 0.46	-0.64 ± 0.49
Metoxamina	-0.70 ± 0.10	-0.92 ± 0.41	-0.16 ± 0.42	-0.26 ± 0.26	-0.32 ± 0.44	0.04 ± 0.51
A61603	-0.70 ± 0.09	-3.73 ± 0.42	2.14 ± 0.43*	n.d.	0.19 ± 0.45	n.d.
Oximetazolina	-2.44 ± 0.10	-1.76 ± 0.39	-0.48 ± 0.40	n.d.	-1.77 ± 0.41	n.d.
Nafazolina	-2.40 ± 0.10	-3.12 ± 0.50	0.51 ± 0.51	n.d.	-1.83 ± 0.41	n.d.

Valores estão representados como a média ± epm dos agonista testados. O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina (ANOVA com teste a *posteriori* Dunnett, *p<0.05).

$$\sigma = \log(\tau_{agonista} / \tau_{noradrenalina})$$
$$\beta = (\sigma_{[Ca^{2+}]_i} - \sigma_{internalização}) / (\sqrt{2})$$

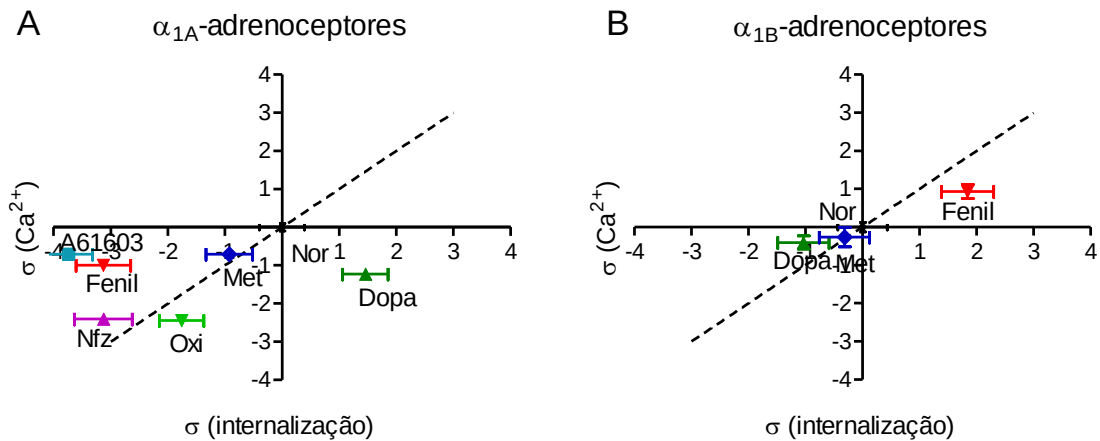


Figura 19. Comparação da sinalização efetiva (σ) das feniletilaminas e imidazolinas na mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). A linha que transpassa a intersecção abscissa-ordenada representa a sinalização balanceada.

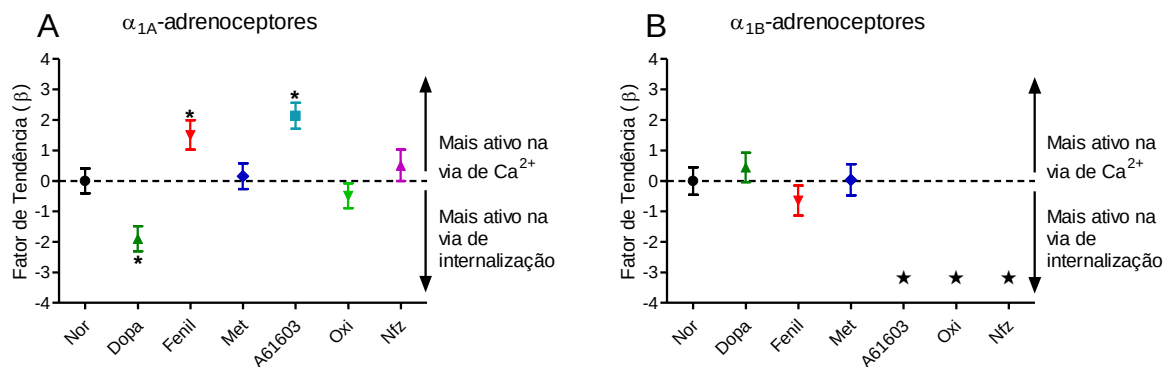


Figura 20. Fatores de tendência (β) das feniletilaminas e imidazolinis na mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina ($p < 0.05$). O símbolo ★ indica a preferência exclusiva do agonista para a via para selecionada.

4.5.2 Razões de τ/K_A

Para o cálculo dos valores de τ/K_A , os dados dos ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e os de internalização foram analisados pelo modelo operacional de agonismo de Black e Leff, reparametrizado (equação [21] do Material e Métodos desta tese) segundo Evans *et al.* (2011). No entanto, diferente da análise proposta por Lefkowitz e colaboradores (Rajagopal *et al.*, 2011), os valores de K_i não foram utilizados como estimativas das afinidades dos agonistas (K_A), de acordo com o que é recomendado por Kenakin e colaboradores (Kenakin *et al.*, 2012). O coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)_{agonista}$ ou “razão de transdução” mostrado na Tabela 6 foi usado para calcular o coeficiente de transdução normalizado $\Delta\log(\tau/K_A)$ em cada via de sinalização (Tabela 7). Similarmente ao que foi feito para sinalização efetiva (σ), os valores de $\Delta\log(\tau/K_A)$ determinados para cada agonista em ambas as vias de sinalização foram comparados àquele do agonista de referência, a noradrenalina (Figura 21). O fator de tendência ($\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$) foi calculado à partir das diferenças de $\Delta\log(\tau/K_A)$ (Tabela 7) e a representação gráfica é mostrada na Figura 22.

Tabela 6. Coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ obtidos pelo modelo operacional (sem utilizar os valores de K_I (obtidos em ensaios de ligação específica com radioligante) como valores de K_A) nos ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização para agonistas de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

	α_{1A} -adrenoceptores		α_{1B} -adrenoceptores	
	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$	Internalização	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$	Internalização
Noradrenalina	7.99 ± 0.05	9.85 ± 0.32	7.12 ± 0.08	6.78 ± 0.27
Dopamina	5.43 ± 0.08	9.90 ± 0.33	5.15 ± 0.12	4.03 ± 0.43
Fenilefrina	7.21 ± 0.08	6.90 ± 0.50	7.08 ± 0.14	7.40 ± 0.26
Metoxamina	6.87 ± 0.08	8.45 ± 0.37	5.08 ± 0.19	4.52 ± 0.34
A61603	9.67 ± 0.06	8.29 ± 0.41	n.d.	6.79 ± 0.25
Oximetazolina	7.99 ± 0.14	9.85 ± 0.34	n.d.	7.56 ± 0.59
Nafazolina	7.50 ± 0.11	8.23 ± 0.49	n.d.	7.45 ± 0.58

Valores de $\log(\tau/K_A)$ estão representados como a média $\pm$ epm dos agonistas testados.

Tabela 7. Coeficiente de transdução normalizado $\Delta\log(\tau/K_A)$ e Fator de tendência ($\Delta\log(\tau/K_A)$) ($[Ca^{2+}]_i$ -internalização) para agonistas em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

α_{1A} -adrenoceptores				α_{1B} -adrenoceptores			
Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$		Internalização	Fator de tendência	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$		Internalização	Fator de tendência
$\Delta\log(\tau/K_A)$		$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$		$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$
Noradrenalina	0.00 ± 0.08	0.00 ± 0.45	0.00 ± 0.45	0.00 ± 0.11	0.00 ± 0.38	0.00 ± 0.40	
Dopamina	-2.66 ± 0.09	0.05 ± 0.46	-2.68 ± 0.47*	-1.98 ± 0.15	-2.75 ± 0.50	0.77 ± 0.53	
Fenilefrina	0.78 ± 0.10	-2.96 ± 0.59	2.13 ± 0.60*	-0.05 ± 0.16	0.63 ± 0.38	-0.68 ± 0.41	
Metoxamina	-1.12 ± 0.10	-1.40 ± 0.48	0.22 ± 0.49	-2.04 ± 0.20	-2.26 ± 0.43	0.22 ± 0.48	
A61603	1.68 ± 0.08	-1.57 ± 0.52	3.03 ± 0.52**	n.d.	0.02 ± 0.37	n.d.	
Oximetazolina	0.00 ± 0.15	-0.01 ± 0.46	-0.69 ± 0.49	n.d.	-0.78 ± 0.65	n.d.	
Nafazolina	-0.49 ± 0.13	-1.62 ± 0.59	0.72 ± 0.60	n.d.	-0.67 ± 0.64	n.d.	

Valores estão representados como a média ± epm dos agonista testados; n.d.: não determinado. O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina (ANOVA com teste a *posteriori* Dunnett, *p<0.05).

$$\Delta\log(\tau/K_A)_{agonista/referência} = \Delta\log(\tau/K_A)_{agonista} - \Delta\log(\tau/K_A)_{referência}$$
$$\Delta\log(\tau/K_A) = \Delta\log(\tau/K_A)_{Mobilização\ de\ [Ca^{2+}]_i} - \Delta\log(\tau/K_A)_{internalização}$$

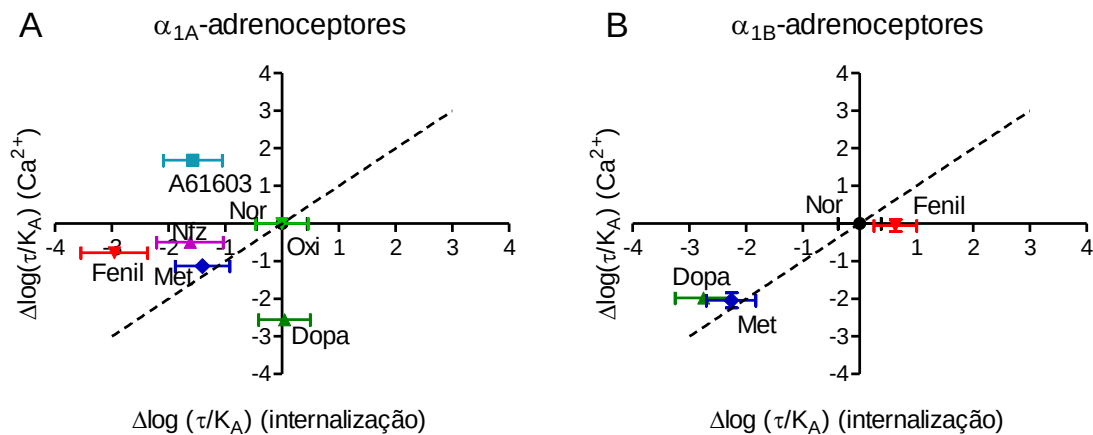


Figura 21. Comparação de $\Delta \log \tau/K_A$ das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). A linha que transpassa a intersecção abscissa-ordenada representa a sinalização balanceada.

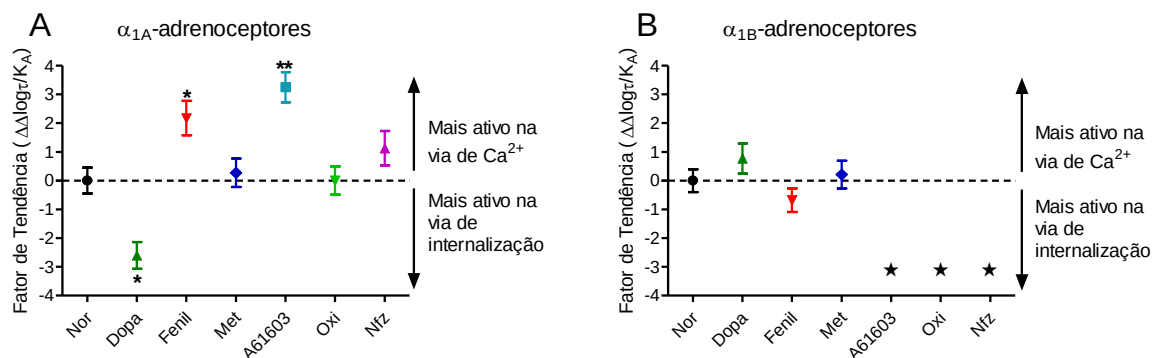


Figura 22. Fatores de tendência ($\Delta \Delta \log \tau/K_A$) das feniletilaminas e imidazolininas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A) e α_{1B} -adrenoceptores (B). O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina ($p < 0.05$). O símbolo ★ indica a preferência exclusiva do agonista para a via para selecionada.

4.6 Repercussões funcionais do agonismo tendencioso da oximetazolina em α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293

Uma vez que as imidazolininas foram virtualmente incapazes de mobilizar de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando os α_{1B} -adrenoceptores, mas internalizaram esses receptores, foi investigada a capacidade da oximetazolina dessensibilizar α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes. A Figura 23 mostra um ensaio cinético de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ por diferentes concentrações de noradrenalina em células HEK293 expressando estavelmente α_{1B} -adrenoceptores e as respectivas curvas concentração-resposta após tratamento com noradrenalina 30 μ M ou oximetazolina 30 μ M por 30 minutos.

A exposição prévia das células HEK293 expressando α_{1B} -adrenoceptores à noradrenalina (30 μ M por 30 minutos) ou oximetazolina (30 μ M por 30 minutos) diminuiu a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela noradrenalina, mostrando que a noradrenalina e a oximetazolina dessensibilizam α_{1B} -adrenoceptores recombinantes, como indicado pelo deslocamento à direita nas curvas concentração-resposta da noradrenalina e oximetazolina (Tabela 8).

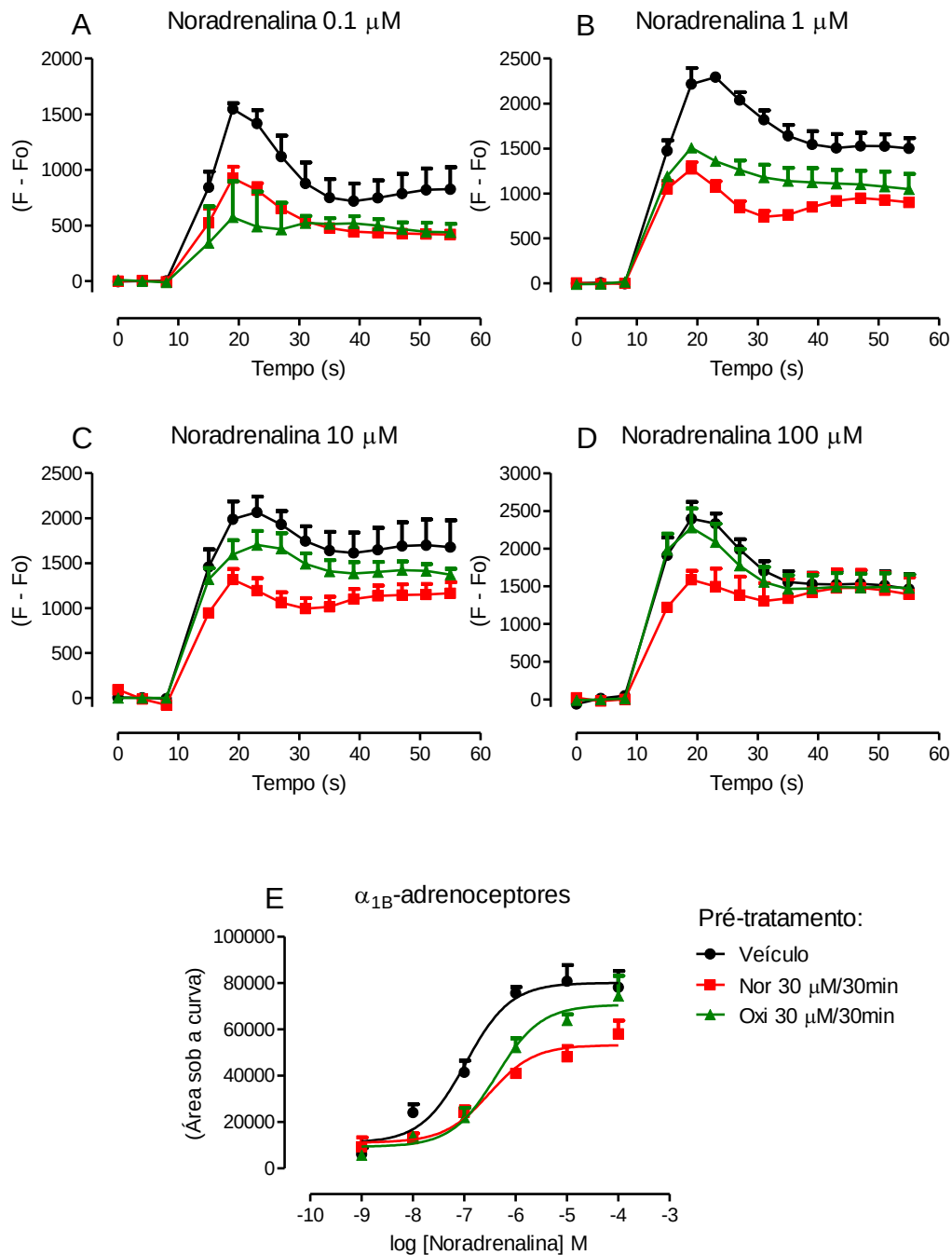


Figura 23. Ensaio cinético de mobilização de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ após estimulação com noradrenalina 0.1 μM (A), 1 μM (B), 10 μM (C) e 100 μM (D) em células HEK293 expressando estavelmente α_{1B} -adrenoceptores, e em (E), as respectivas curvas concentração-resposta após tratamento com noradrenalina 30 μM ou oximetazolina 30 μM por 30 minutos. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos.

Tabela 8. Potência (pEC_{50}), internalização máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para noradrenalina após tratamento para os ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

	Veículo	Noradrenalina 30 $\mu M/30$ minutos	Oximetazolina 30 $\mu M/30$ minutos
pEC_{50}	6.98 ± 0.15	$6.41 \pm 0.18^*$	$6.38 \pm 0.16^*$
E_{max}	80.114 ± 3446	$49.891 \pm 2402^{***}$	70.622 ± 3429
α	1.00	0.62	0.88

Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 4 experimentos independentes. O coeficiente de Hill (*Hill slope*) das curvas não diferiu da unidade teórica (1.0). O símbolo * representa diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (veículo) (ANOVA com teste a posteriori Dunnett, $***p < 0.001$).

4.7 Repercussões funcionais do agonismo tendencioso da oximetazolina em α_{1B} -adrenoceptores nativos de baço de rato

Uma vez que a oximetazolina e a noradrenalina dessensibilizaram os α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293, foi investigado se essas drogas dessensibilizam os α_{1B} -adrenoceptores do baço de rato.

A Figura 24 mostra curvas concentração-resposta consecutivas da noradrenalina e da oximetazolina nas contrações do baço de rato e as respectivas potências e respostas máximas são mostradas na Tabela 9. Pelo menos três curvas concentração-resposta consecutivas para noradrenalina no baço de rato apresentaram potências e resposta máximas semelhantes. Entretanto, não foi possível construir curvas concentração-resposta consecutivas de oximetazolina, uma vez que o baço não contraiu após uma segunda ou terceira exposição à este agonista.

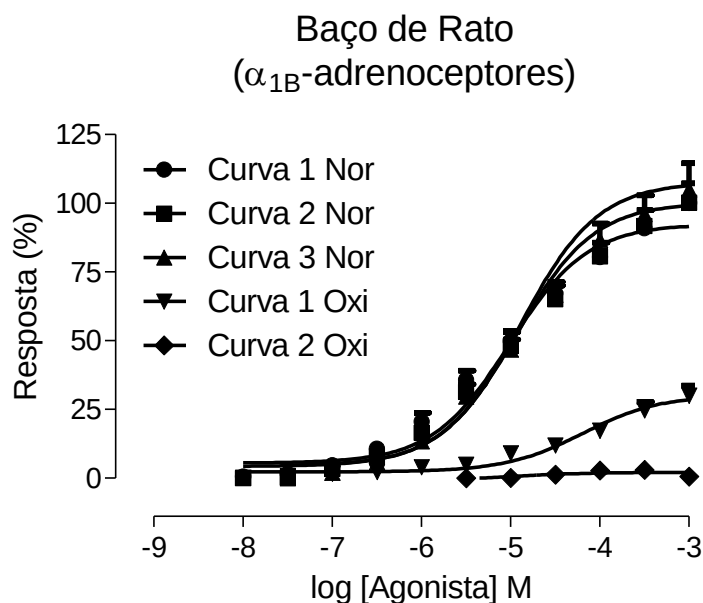


Figura 24. Curvas concentração-resposta consecutivas de noradrenalina ou oximetazolina no baço de rato resultante da ativação de α_{1B} -adrenoceptores. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 4 experimentos.

Tabela 9. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para feniletilamina noradrenalina e a imidazolina oximetazolina na contração do baço de rato (efeito resultante da ativação de α_{1B} -adrenoceptores nativos).

		Curvas consecutivas		
		Curva 1	Curva 2	Curva 3
Noradrenalina	pEC_{50}	5.00 ± 0.06	4.93 ± 0.07	4.88 ± 0.06
	E_{max}	92.44 ± 2.07	$100.30 \pm 2.86^*$	$107.80 \pm 2.47^{**}$
	α	1.00	1.09	1.17
Oximetazolina	pEC_{50}	4.19 ± 0.06	Inativa	Inativa
	E_{max}	30.30 ± 2.14	Inativa	Inativa
	α	0.33	Inativa	Inativa

Valores são apresentados como media $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 4 experimentos. O símbolo * representa diferença estatística das curvas consecutivas (ANOVA com teste *a posteriori* Newman-Keuls, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Uma vez que houve intensa taquifilaxia nas contrações induzidas pela oximetazolina em curvas concentração-resposta consecutivas, foi investigado se a oximetazolina induz taquifilaxia nas respostas contráteis do baço de rato à noradrenalina. A Figura 25 mostra curvas concentração-resposta de noradrenalina 45 min após o tratamento do baço de rato com noradrenalina 100 μ M (por 15 e 30 minutos) (Figura 25A) ou oximetazolina 100 μ M (por 5 e 15 minutos) (Figura 25B). O tratamento prévio com noradrenalina 100 μ M por 5 ou 30 minutos não modificou a curva concentração-resposta de noradrenalina (Figura 25A, Tabela 10). Entretanto, o tratamento prévio com oximetazolina 100 μ M por 15 minutos promoveu taquifilaxia na curva concentração-resposta de noradrenalina (Figura 25B, Tabela 10). Não houve taquifilaxia quando o tratamento prévio com oximetazolina 100 μ M por 15 minutos foi realizado na presença de prazosin 10 nM, indicando que este efeito da oximetazolina depende da ativação de α_{1B} -adrenoceptores (Figura 26, Tabela 10).

Portanto, apesar de se comportar como um fraco agonista parcial nas contrações do baço de rato, oximetazolina dessensibilizou os α_{1B} -adrenoceptores deste tecido.

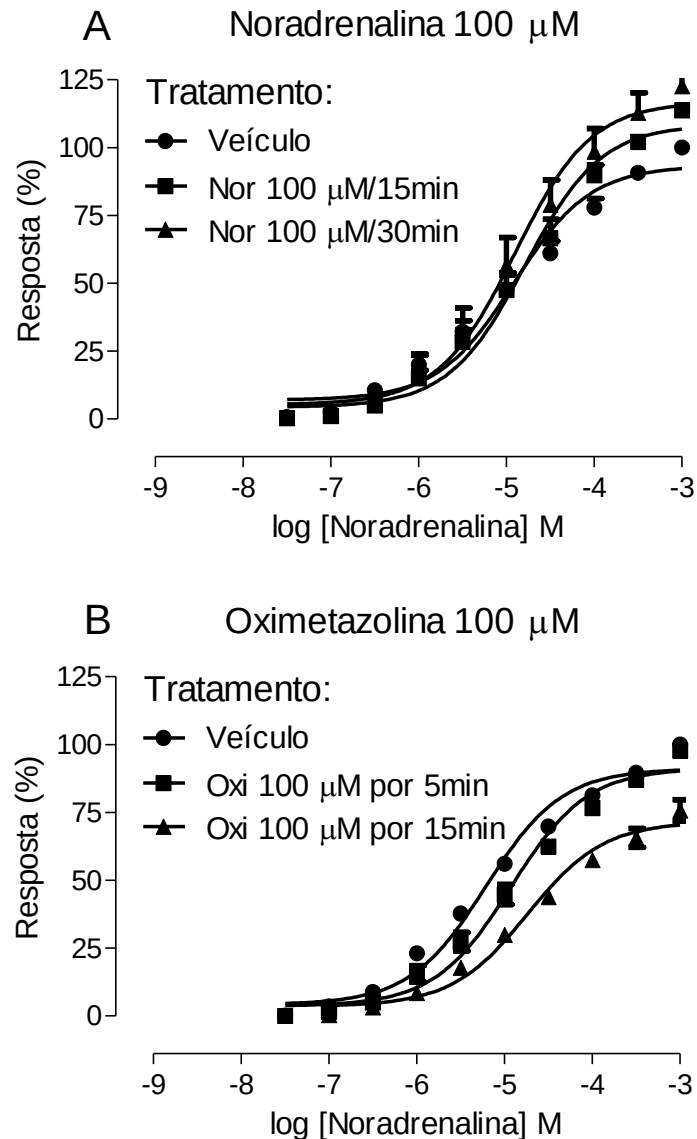


Figura 25. Curvas concentração-resposta de noradrenalina no baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores) pré-tratado com veículo, noradrenalina 100 μ M ou oximetazolina 100 μ M. Em (A), curvas concentração resposta de noradrenalina após tratamento por 5 ou 30 minutos de noradrenalina 100 μ M. Em (B), curvas concentração-resposta de noradrenalina após tratamento por 5 ou 15 minutos de oximetazolina 100 μ M. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos.

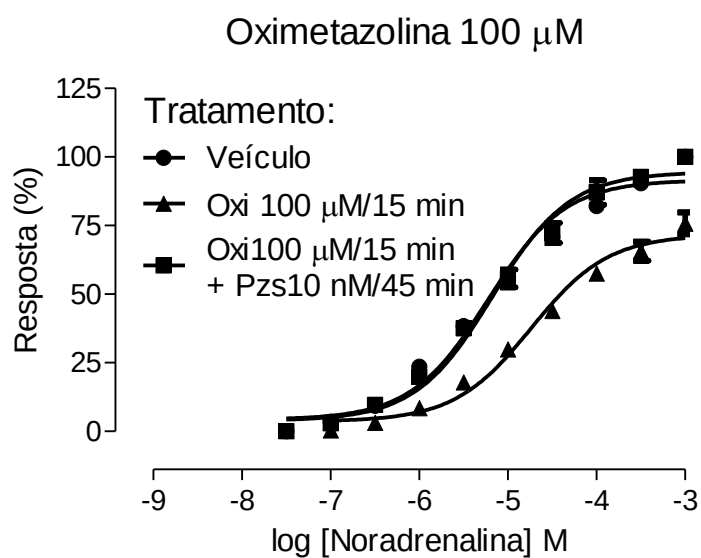


Figura 26. Curvas concentração-resposta de noradrenalina antes e após tratamento por 15 minutos de oximetazolina 100 μ M na ausência e na presença de prazosin 10 nM pré-incubado por 30 minutos. Cada símbolo representa média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos.

Tabela 10. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para feniletilamina noradrenalina após tratamento com noradrenalina 100 μ M ou oximetazolina 100 μ M obtidos em ensaios de contração de baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores nativos).

		Tratamento		
		Noradrenalina 100 μ M	Oximetazolina 100 μ M	Oximetazolina 100 μ M + Prazosin 10 nM/45min
Veículo	pEC_{50}	4.91 $\pm$ 0.08	5.21 $\pm$ 0.04	5.23 $\pm$ 0.09
	E_{max}	93.27 $\pm$ 2.81	91.12 $\pm$ 1.43	93.3 $\pm$ 2.81
	α	1.00	1.00	1.00
5 minutos	pEC_{50}	4.79 $\pm$ 0.07	4.93 $\pm$ 0.06**	n.d.
	E_{max}	108.6 $\pm$ 3.13*	91.31 $\pm$ 2.03	n.d.
	α	1.16	1.00	n.d.
15 minutos	pEC_{50}	n.d.	4.74 $\pm$ 0.06***	5.17 $\pm$ 0.06
	E_{max}	n.d.	71.66 $\pm$ 1.74***	94.53 $\pm$ 2.13
	α		0.79	1.01
30 minutos	pEC_{50}	4.90 $\pm$ 0.10	n.d.	n.d.
	E_{max}	116.9 $\pm$ 4.51**	n.d.	n.d.
	α	1.25	n.d.	n.d.

Valores são apresentados como media $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 4 experimentos O símbolo * representa diferença estatística dos tratamentos temporais em relação ao controle (veículo) (ANOVA com teste a posteriori Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.8 Comparação do $\text{Log}(\text{1/K}_A)$ de agonistas de α_1 -adrenoceptores em receptores nativos do rato e humanos recombinantes

As “eficácias” das feniletilaminas e imidazolininas em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores nativos do rato foram estimadas em estudos das contrações induzidas por estas drogas no ducto deferente e baço, tecidos cujas contrações em resposta à agonistas adrenérgicos são mediadas pela ativação de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores, respectivamente (Burt *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2005).

A Figura 27 mostra curvas concentração-resposta das feniletilaminas e imidazolininas no ducto deferente (Figura 27A e Figura 27C) e baço de rato (Figura 27B e Figura 27D). As respectivas potências e respostas máximas estão mostradas na Tabela 11. Todas as feniletilaminas se comportaram como agonistas totais no ducto deferente em relação à noradrenalina. Entretanto, as imidazolininas oximetazolina e nafazolina foram agonistas parciais, enquanto que o A61603 foi um agonista total em relação à noradrenalina. Já no baço de rato, das feniletilaminas, apenas a noradrenalina e a fenilefrina foram agonistas totais, enquanto que a dopamina e a metoxamina foram virtualmente incapazes contrair este tecido; das imidazolininas, o A61603 e a oximetazolina foram agonistas parciais em relação à noradrenalina e a nafazolina foi virtualmente incapaz de contrair este tecido.

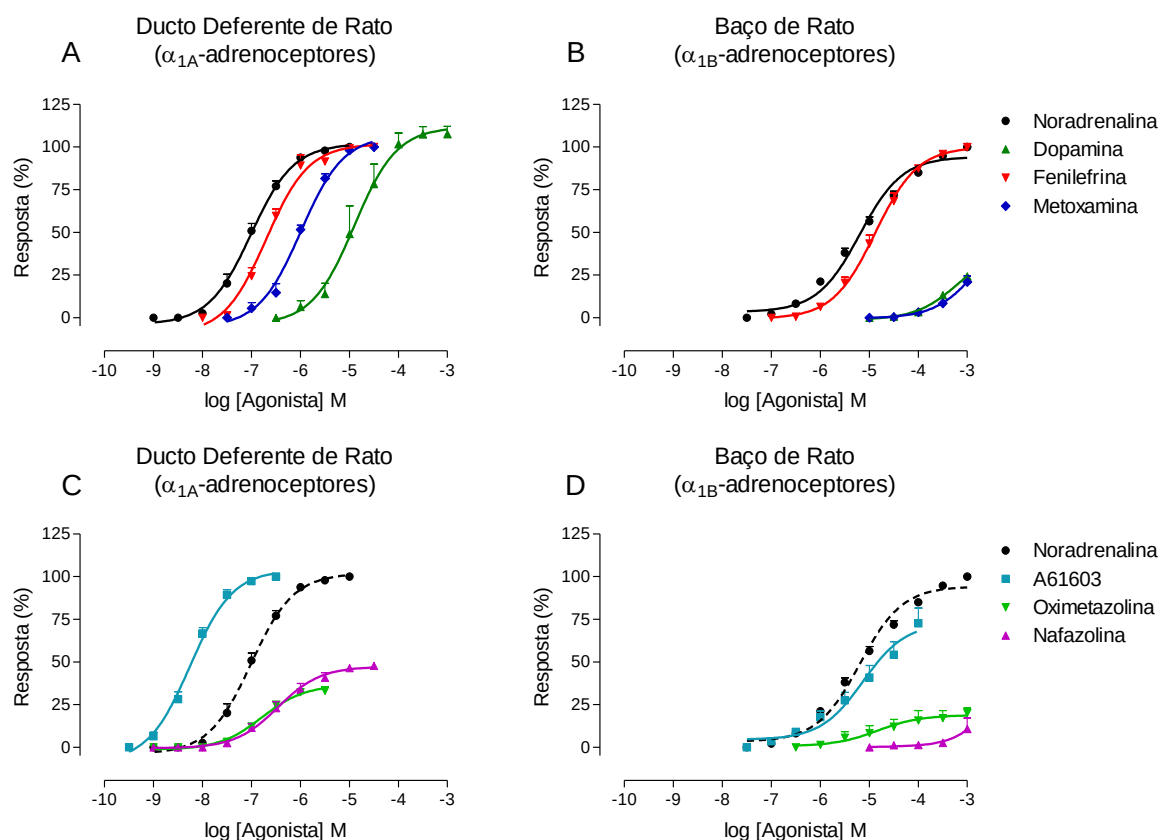


Figura 27. Curvas concentração-resposta das feniletilaminas (A e B) e imidazolinias (C e D) nas contrações do ducto deferente (α_{1A} -adrenoceptores) (A e C) e baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores) (B e D). Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 5 experimentos. Os dados foram normalizados para as respostas máximas da noradrenalina.

Tabela 11. Potência (pEC_{50}), resposta máxima (E_{max}) e atividade intrínseca (α) para agonistas de α_1 -adrenoceptores nas contrações do ducto deferente (α_{1A} -adrenoceptores) e baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores).

		Ducto Deferente de Rato (α_{1A} -adrenoceptores)	Baço de Rato (α_{1B} -adrenoceptores).
Noradrenalina	pEC_{50}	7.00 ± 0.04	5.19 ± 0.04
	E_{max}	101.9 ± 1.7	94.3 ± 1.5
	α	1.00	1.00
Dopamina	pEC_{50}	4.90 ± 0.13	n.d.
	E_{max}	111.7 ± 5.3	n.d.
	α	1.07	n.d.
Fenilefrina	pEC_{50}	6.70 ± 0.06	4.88 ± 0.04
	E_{max}	101.7 ± 2.2	100.0 ± 1.8
	α	1.00	1.06
Metoxamina	pEC_{50}	5.99 ± 0.05	n.d.
	E_{max}	106.7 ± 2.6	n.d.
	α	1.04	n.d.
A61603	pEC_{50}	8.25 ± 0.05	5.13 ± 0.16
	E_{max}	103.9 ± 2.1	72.77 ± 5.9
	α	1.02	0.73
Oximetazolina	pEC_{50}	6.78 ± 0.08	4.83 ± 0.34
	E_{max}	36.4 ± 1.47	18.8 ± 2.4
	α	0.33	0.20
Nafazolina	pEC_{50}	6.46 ± 0.07	n.d.
	E_{max}	47.3 ± 1.4	n.d.
	α	0.48	n.d.

Valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de 3 a 5 experimentos. O coeficiente de Hill (*Hill slope*) das curvas não diferiu da unidade (1.0).

Ordem de potência (ANOVA seguida de Newman-Keuls ($p < 0.05$)):

Ducto deferente de rato: A61603^a > Noradrenalina^b > Oximetazolina^c $\cong$ Fenilefrina^c > Nafazolina^d > Metoxamina^e > Dopamina^f

Baço de rato: Noradrenalina^a $\cong$ A61603^a $\cong$ Fenilefrina^a $\cong$ Oximetazolina^a >> Dopamina^b $\cong$ Metoxamina^b $\cong$ Nafazolina^b

As Figura 28 e 29 mostram as curvas concentração-resposta dos agonistas de α_1 -adrenoceptores no ducto deferente de rato (Figura 28) e baço de rato (Figura 29) das quais os valores de $\log \tau$ e $\log K_A$ foram derivados segundo o modelo operacional de Black e Leff e posteriormente utilizados para o cálculo do coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ (Tabela 12). Os coeficientes de transdução $\log(\tau/K_A)$ determinados em ensaios de contração de ducto deferente e baço de rato foram comparados àqueles obtidos em ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou internalização de α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores recombinantes expressos em células HEK293 (Figura 30). É interessante notar que houve forte correlação entre os $\log(\tau/K_A)$ determinados na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ pelos de α_{1A} -adrenoceptores recombinantes e na contração do ducto deferente de rato, mas não houve correlação quando os valores determinados nos ensaios de contração foram comparados com aqueles determinados na internalização. Entretanto, não houve clara correlação entre os $\log(\tau/K_A)$ determinados na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou de internalização de α_{1B} -adrenoceptores e as respostas contráteis do baço de rato.

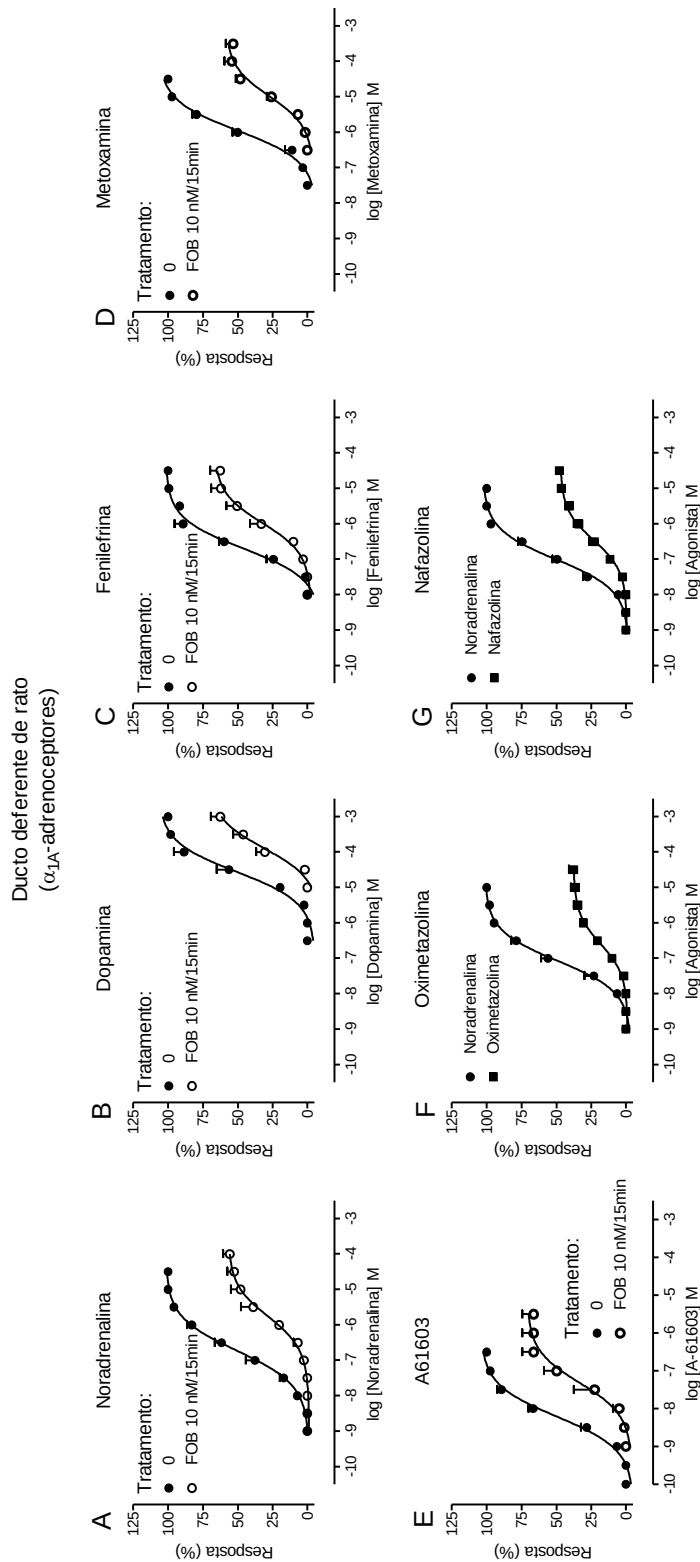


Figura 28. Curvas concentração-resposta para os agonistas de α_{1A} -adrenoceptores em ducto deferente de rato utilizadas para o cálculo do coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ pelo modelo operacional. As curvas concentração-resposta das feniletilaminas noradrenalina (A), dopamina (B), fenilefrina (C) e metoxamina (D) e a imidazolina A61603 (E) estão mostradas antes e após o tratamento com fenoxybenzamina (FOB) 10 nM por 15 minutos. As curvas concentração-resposta dos agonistas parciais oximetazolina (F) e nafazolina (G) foram comparados ao agonista de referência noradrenalina. Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 5 experimentos.

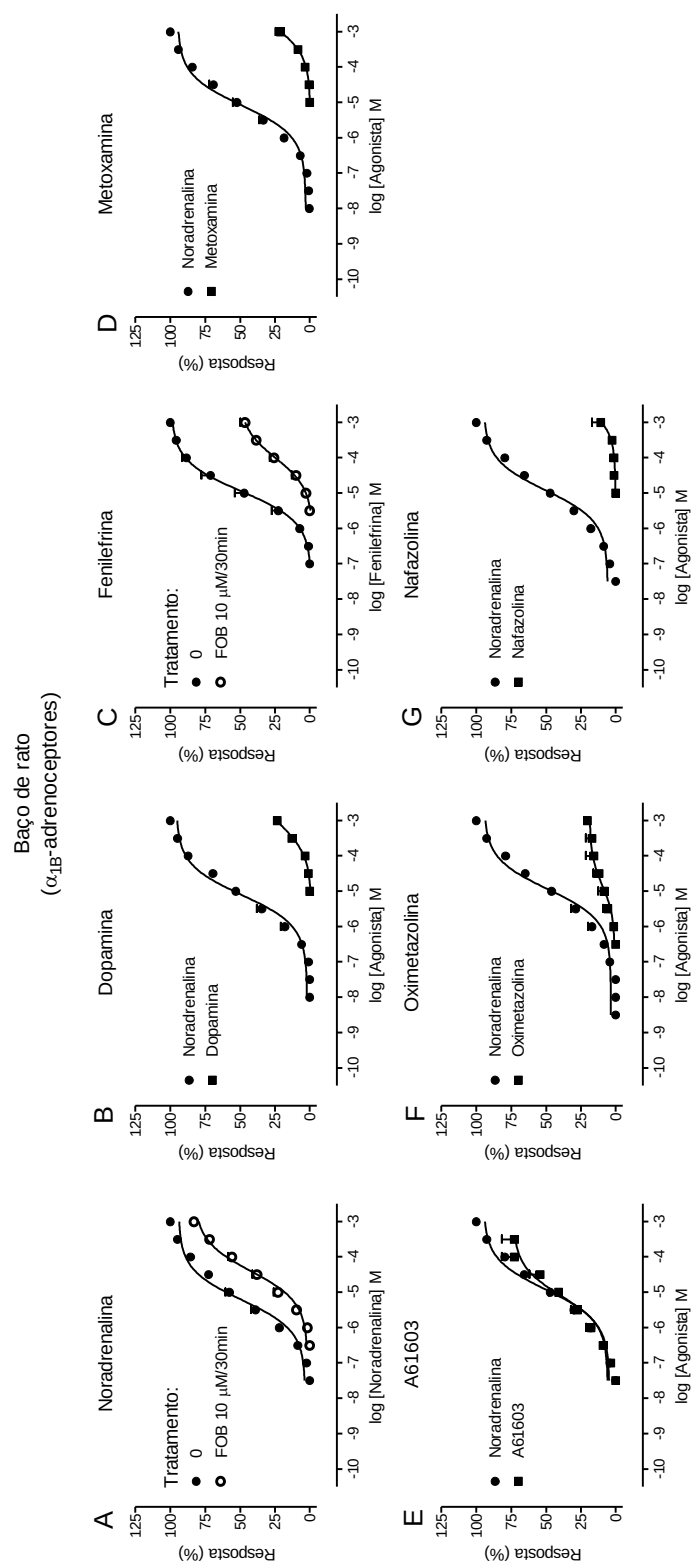


Figura 29. Curvas concentração-resposta para os agonistas de α_1 -adrenoceptores em baço de rato utilizadas para o cálculo do coeficiente de transdução $\log(\pi/K_A)$ pelo modelo operacional. As curvas concentração-resposta das feniletilaminas noradrenalina (A) e fenilefrina (C) estão mostradas antes e após o tratamento com fenoxibenzamina (FOB) 10 nM por 15 minutos. As curvas concentração-resposta dos agonistas que não foram agonistas totais, dopamina (B), metoxamina (D), A61603 (E) oximetazolina (F) e nafazolina (G), foram comparados ao agonista de referência noradrenalina. Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 5 experimentos.

Tabela 12. $\log \tau$, $\log K_A$ e coeficiente de transdução $\log(\tau K_A)$ obtidos pelo modelo operacional nos ensaios de contração de ducto deferente de rato (α_{1A} -adrenoceptores) e baço de rato (α_{1B} -adrenoceptores).

	Ducto Deferente de Rato (α_{1A} -adrenoceptores)			Baço de Rato (α_{1B} -adrenoceptores)		
	$\log \tau$	$\log K_A$	$\log(\tau K_A)$	$\log \tau$	$\log K_A$	$\log(\tau K_A)$
Noradrenalina	1.40 ± 0.19	-5.36 ± 0.15	6.76 ± 0.24	2.53 ± 0.17	-2.63 ± 0.18	5.16 ± 0.25
Dopamina	0.90 ± 0.11	-3.69 ± 0.22	4.60 ± 0.24	n.d.	n.d.	n.d.
Fenilefrina	0.82 ± 0.14	-5.86 ± 0.17	6.68 ± 0.22	1.21 ± 0.16	-3.66 ± 0.07	4.87 ± 0.18
Metoxamina	1.09 ± 0.09	-4.92 ± 0.07	6.01 ± 0.12	n.d.	n.d.	n.d.
A61603	1.19 ± 0.10	-7.07 ± 0.13	8.26 ± 0.16	0.85 ± 0.34	-3.84 ± 0.16	4.68 ± 0.37
Oximetazolina	-0.15 ± 0.06	-6.43 ± 0.11	6.27 ± 0.13	-0.96 ± 0.06	-4.07 ± 0.49	3.11 ± 0.49
Nafazolina	-0.05 ± 0.01	-6.11 ± 0.20	6.06 ± 0.20	n.d.	n.d.	n.d.

Valores estão representados como a média $\pm$ epm dos agonistas testados.

$$\log(\tau K_A) = \log \tau - \log K_A$$

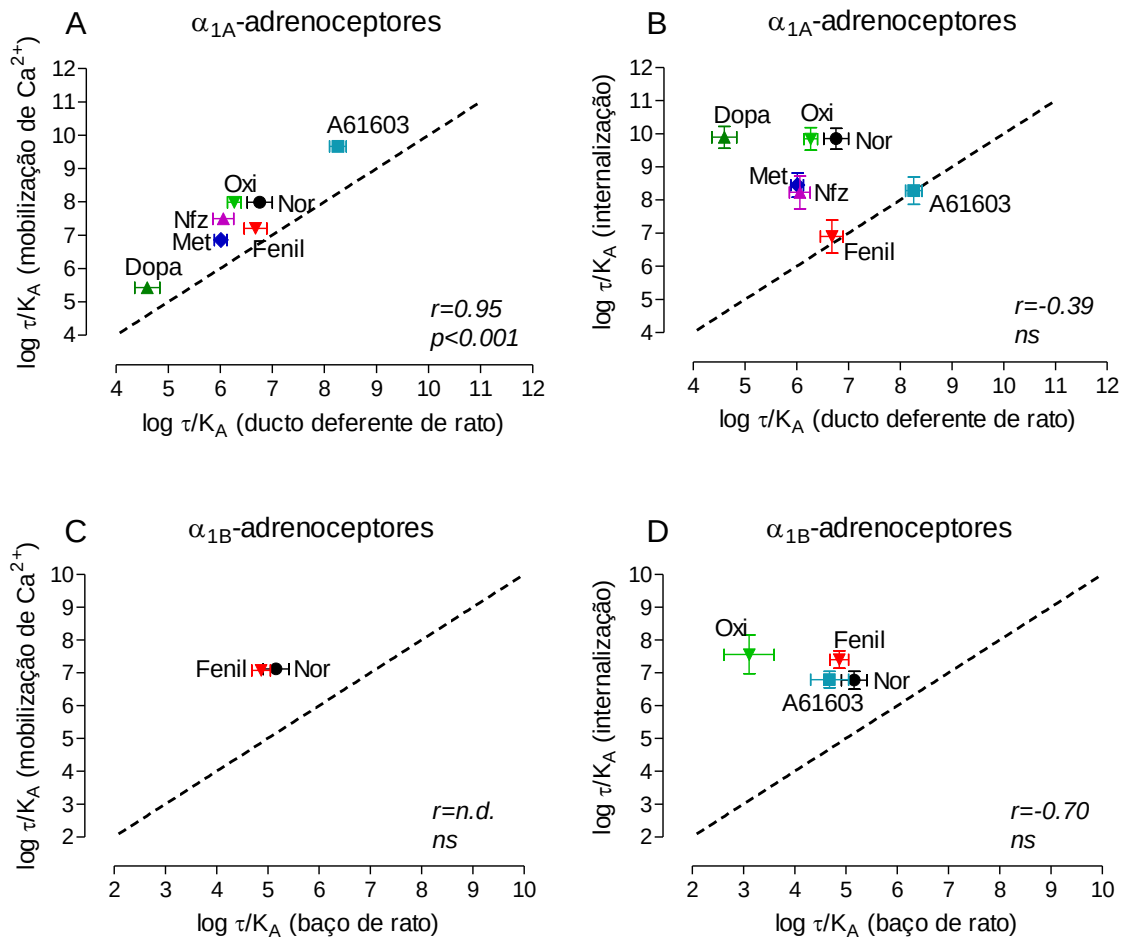


Figura 30. Comparação do coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ para feniletilaminas e imidazolininas para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou internalização de α_{1A} -adrenoceptores (A e B) e α_{1B} -adrenoceptores (C e D) vs. coeficiente de transdução $\log(\tau/K_A)$ obtidos em ensaios de contração de ducto deferente de rato (A e B) e baço de rato (C e D). A linha representa uma correlação perfeita entre as razões testadas.

Discussão

5. Discussão

O presente trabalho investigou se drogas comumente utilizadas como agonistas de α_1 -adrenoceptores (as feniletilaminas noradrenalina, dopamina, fenilefrina, metoxamina, e as imidazolinas A61603, oximetazolina e nafazolina) comportam-se como agonistas tendenciosos na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e na internalização de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores. A mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e a internalização refletem a capacidade destas drogas ativarem a proteína G_q ou recrutarem outras proteínas acessórias, como a β -arrestina, respectivamente.

O agonismo tendencioso é caracterizado por reversões de ordem de potências e/ou de eficácias de drogas nas diferentes vias de sinalização disparadas pela ativação de seus receptores (Gesty-Palmer e Luttrell, 2011; Kenakin e Christopoulos, 2011). No presente estudo, houve reversões nas ordens de potências e/ou de eficácias de algumas feniletilaminas e imidazolinas na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e na internalização de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores. Em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores humanos recombinantes, a dopamina foi $\cong 479$ vezes menos potente do que a noradrenalina na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ (Tabela 2), mas ambos os agonistas foram equipotentes na internalização destes receptores (Tabela 3). Também chama a atenção o fato de que o A61603 foi $\cong 47$ vezes mais potente que a noradrenalina na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores (Tabela 2), porém foi $\cong 38$ vezes menos potente que a noradrenalina na internalização (Tabela 3). Já em células HEK293 expressando α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes, houve claras reversões de eficácias, uma vez que as imidazolinas foram virtualmente incapazes de mobilizar $[Ca^{2+}]_i$ (Tabela 2), mas internalizaram os α_{1B} -adrenoceptores (Tabela 3).

O gráfico de tendência (*bias plot*), o qual compara efeitos produzidos pelas mesmas concentrações de um agonista em dois ensaios diferentes, foi útil para visualizar o agonismo tendencioso de algumas feniletilaminas e imidazolininas em relação ao agonista de referência, a noradrenalina (ver Figura 18). Entretanto, apesar de mostrar a relação entre os agonistas e as respectivas vias de sinalização, não é possível quantificar numericamente num gráfico de tendência a seletividade funcional de um agonista frente uma ou outra via de sinalização, tampouco é possível avaliar estatisticamente as diferenças observadas em relação ao agonista de referência. Portanto, é necessária uma abordagem quantitativa para a avaliação do agonismo tendencioso. Desta forma, foram empregados dois métodos quantitativos descritos na literatura, o de Rajagopal *et al.* (2011) e o de Kenakin *et al.* (2012).

Um dos métodos quantitativos propostos, o de Rajagopal e colaboradores, utiliza-se do cálculo de um fator de tendência (β) baseado na atividade relativa intrínseca (RA_i) de Ehlert (Griffin *et al.*, 2007) e requer apenas os valores de E_{max} e EC_{50} obtidos nas curvas concentração-resposta dos agonistas nos respectivos ensaios, desde que o coeficiente de inclinação das curvas não seja diferente da unidade teórica (Rajagopal *et al.*, 2011). Entretanto, como $\log[(E_{max})/(EC_{50})]$ é o equivalente operacional de $\log(\tau K_A)$ (Griffin *et al.*, 2007), a equação que descreve o fator de tendência β ao ser reescrita utilizando-se o modelo operacional de Black & Leff (1983) resulta numa equação semelhante àquela descrita por Kenakin e colaboradores para o cálculo do fator de tendência $\Delta\Delta\log(\tau K_A)$.

Ambos os métodos de quantificação de agonismo tendencioso em α_{1A} -adrenoceptores (fator β e $\Delta\Delta\log(\tau K_A)$) apontaram que a dopamina apresenta

seletividade funcional para a internalização e que a fenilefrina e o A61603 apresentam seletividade funcional para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$. No entanto, o valor absoluto das tendências calculadas por ambos os métodos (10^β e $10^{\Delta\log(\tau/K_A)}$, (Kenakin et al., 2012) diferiu sensivelmente. Estes valores de tendência absoluta mostram que a dopamina foi $\cong 79$ (razões de τ) ou $\cong 479$ (razões de τ/K_A) vezes mais ativa na internalização do que na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$. O mesmo é observado para o A61603, $\cong 138$ (razões de τ) ou $\cong 1072$ (razões de τ/K_A), e a fenilefrina, $\cong 32$ (razões de τ) ou 135 (razões de τ/K_A) vezes mais ativos na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ do que na internalização. A razão matemática para esta grande diferença vem da divisão do fator de tendência β pela $\sqrt{2}$ no modelo descrito por Rajagopal et al., (2011). A divisão pela $\sqrt{2}$ resulta do cálculo da distância entre a localização do agonista teste e a linha da identidade (ou balanceada) que transpassa a intersecção entre os eixos da abscissa e da ordenada do gráfico cartesiano de sinalizações efetivas (σ) (ver o exemplo da Figura 19).

Apesar de ambos os métodos de quantificação da tendência discutidos acima discriminarem os mesmos agonistas tendenciosos, há algumas desvantagens na utilização de razões de τ , como por exemplo, a necessidade de ensaios de ligação com radioligantes para determinar os valores de K_I que serão utilizados como “substitutos” dos valores de afinidade K_A dos agonistas ao receptor e a diferença marcante no valor de tendência absoluta resultante da divisão pela $\sqrt{2}$. Apesar da semelhança entre as equações que descrevem o fator de tendência β e o $\Delta\log(\tau/K_A)$, é importante reconhecer que, conceitualmente, é preferível quantificar o agonismo tendencioso utilizando o modelo operacional e o fator de tendência $\Delta\log(\tau/K_A)$ ao invés das medidas e do fator de tendência (β), pois esta última forma desconsidera a possibilidade de que a afinidade do agonista pelo receptor em cada

uma das vias de sinalização pode diferir em razão da natureza da proteína acessória recrutada (por exemplo, a proteína G ou β -arrestina).

Recentemente, foi demonstrado em α_{1A} -adrenoceptores humanos recombinantes estavelmente expressos em células CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary cells*) que as feniletilaminas fenilefrina e metoxamina e as imidazolinas A61603 oximetazolina e cirazolina apresentam agonismo tendencioso para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, formação de cAMP ou na taxa de acidificação extracelular (*extracellular acidification rate*, ECAR) (Evans *et al.*, 2011). Foi observado que as imidazolinas A61603 e cirazolina foram agonistas tendenciosos para o cAMP contra a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$; a fenilefrina e metoxamina foram agonistas tendenciosos para ECAR (*extracellular acidification rate*) contra cAMP; e a fenilefrina e oximetazolina tendenciosas para ECAR contra mobilização de $[Ca^{2+}]_i$. A comparação dos dados do presente trabalho relativos à internalização ($\Delta \log(1/K_A)$, mostrados na Tabela 7) com aqueles relativos ao cAMP, ECAR e $[Ca^{2+}]_i$ descritos por Evans *et al.* (2011) (ver Tabelas A1 e A2 do Apêndice C), mostra a seguinte ordem de tendência para a fenilefrina: ECAR > $[Ca^{2+}]_i$ = cAMP > internalização; e para o A61603: cAMP $\geq$ ECAR $\geq$ $[Ca^{2+}]_i$ > internalização. Entretanto, não foi investigado se o agonismo tendencioso apresentado por estes agonistas tem alguma repercussão funcional.

É interessante notar que a dopamina também apresentou agonismo tendencioso para a internalização em α_{1A} -adrenoceptores. Isso pode explicar a taquifilaxia encontrada para a dopamina, mas não para a noradrenalina, nas contrações do ducto deferente de rato (Langeloh e Jurkiewicz, 1982). Uma vez que a contração deste tecido é um modelo de resposta mediada por α_{1A} -adrenoceptores (Lima *et al.*, 2005; Pupo, 1998), esses efeitos da dopamina indicam que há uma

repercussão funcional do agonismo tendencioso encontrado para a dopamina nos α_{1A} -adrenoceptores e que isso merece ser mais profundamente investigado.

Em células HEK293 expressando α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes, nenhuma das feniletilaminas investigadas apresentou agonismo tendencioso à mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou internalização, enquanto que não foi possível determinar os fatores de tendência das imidazolinas, uma vez que elas foram incapazes de mobilizar $[Ca^{2+}]_i$, a despeito de internalizarem os α_{1B} -adrenoceptores. Apesar de não ser possível quantificar numericamente um fator de tendência, a capacidade das imidazolinas internalizarem os receptores, mas não promoverem uma mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, indica preferência exclusiva para a internalização. No entanto, é importante reconhecer que a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta à ativação dos α_{1B} -adrenoceptores pode ser um evento pouco amplificado por ser próximo do receptor na cascata de reações intracelulares disparadas por sua ativação e que isto não significa que os α_{1B} -adrenoceptores ativados pelas imidazolinas são incapazes de recrutar a proteína G_q . Já é bem descrita na literatura a interação de agonistas com os α_{1B} -adrenoceptores promovendo a formação de inositol fosfato (Minneman *et al.*, 1994). A ordem de potência de vários agonistas no acúmulo de inositol fosfato foi semelhante àquela encontrada para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ no presente estudo, o que não é surpreendente já que ambos efeitos dependem e são formados rapidamente após ativação da proteína G_q .

Uma vez que as imidazolinas apresentaram preferência pela internalização dos α_{1B} -adrenoceptores do que pela mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, foi investigado se este agonismo tendencioso tem alguma repercussão funcional. De fato, o tratamento de células HEK293 expressando α_{1B} -adrenoceptores com oximetazolina promoveu taquifilaxia na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta à

noradrenalina. O agonismo tendencioso também se manifestou em α_{1B} -adrenoceptores nativos do baço de rato, uma vez que houve intensa taquifilaxia nas contrações deste tecido em resposta a reexposições à oximetazolina. Tais dados são importantes, pois indicam que o agonismo tendencioso da oximetazolina não é uma propriedade restrita a sistemas receptores recombinantes.

Os coeficientes de transdução $\log(\tau/K_A)$ das fenietilaminas e imidazolininas obtidos em ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou internalização de α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores expressos em células HEK293 (Figura 30) foram comparados com aqueles determinados em ensaios de contração do ducto deferente e baço de rato, tecidos cujas contrações em resposta a agonistas adrenérgicos são mediadas pela ativação de α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores, respectivamente (Burt *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2005). Tal comparação permitiu checar se há semelhança nas ordens de $\log(\tau/K_A)$ de agonistas promoverem seus efeitos em dois receptores ortólogos, isto é, o receptor humano recombinante e o nativo do rato. Tanto para as fenietilaminas quanto para as imidazolininas, houve forte correlação entre o $\log(\tau/K_A)$ determinado na contração do ducto deferente e na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores, mas não na internalização destes receptores. A semelhança nas ordens de $\log(\tau/K_A)$ na contração e na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ mostra que os agonistas apresentaram eficácias semelhantes nestas vias de sinalização disparadas por estes dois receptores ortólogos. Já a fraca correlação entre os valores de $\log(\tau/K_A)$ dos agonistas na contração do ducto deferente e na internalização dos α_{1A} -adrenoceptores em células HEK293 é um bom indicador de que as vias de sinalização disparadas para a produção destes dois efeitos são distintas. Entretanto, não foi possível investigar apropriadamente a correlação entre

o $\log(\tau/K_A)$ determinado na contração do baço e na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando α_{1B} -adrenoceptores, uma vez que muitas drogas comportaram-se como fracos agonistas parciais neste tecido, o que impediu a construção de curvas concentração-resposta completas. Por outro lado, não houve clara correlação entre o $\log(\tau/K_A)$ no baço e na internalização de α_{1B} -adrenoceptores em células HEK293, suportando a ideia de que as vias de sinalização envolvidas nestes dois efeitos disparados por estes receptores ortólogos são distintas.

É importante identificar o agonismo tendencioso das drogas que ativam α_1 -adrenoceptores, pois isto pode ser terapeuticamente vantajoso. É sabido que o coração expressa predominantemente de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores e cada subtipo está envolvido numa variedade de efeitos quando estimulados (Jensen *et al.*, 2011; Perez e Doze, 2011). Por exemplo, há excesso de catecolaminas circulantes (noradrenalina e adrenalina) na insuficiência cardíaca e acredita-se que a ativação crônica de receptores acoplados à proteína G_q tais como os α_1 -adrenoceptores, é prejudicial levando à hipertrofia, apoptose e insuficiência contrátil (Noor *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, há evidências de que a utilização de antagonistas de α_1 -adrenoceptores no tratamento da hipertensão associada a hiperlipidemia pode ser prejudicial, pois aumenta a incidência de insuficiência cardíaca e mortalidade (Jensen *et al.*, 2011; Perez e Doze, 2011). Estas informações aparentemente conflitantes podem ser conciliadas pelo fato de que a ativação de α_{1A} -adrenoceptores nos miócitos dispara sinalização intracelular dependente de ERK1/2 que resulta num efeito cardioprotetor ao promover hipertrofia adaptativa, redução de apoptose e pré-condicionamento isquêmico (Jensen *et al.*, 2011), enquanto que a ativação de α_{1B} -adrenoceptores leva à mal adaptação (Perez e Doze, 2011). A ativação de α_{1A} -adrenoceptores no sistema nervoso central também tem sido

associada a efeitos neuroprotetivos, pois promove neurogênese, aumenta o aprendizado e a memória, melhora o humor, e podem proteger o cérebro de anoxia, injúria traumática, ataques epiléticos e neurodegeneração idade-dependente (Perez e Doze, 2011). Assim, agonistas que ativem preferencialmente α_{1A} -adrenoceptores podem ser candidatos terapêuticos no tratamento da insuficiência cardíaca (Jensen *et al.*, 2011) e no tratamento de diversas desordens neurológicas (Perez e Doze, 2011). Entretanto ainda não está clara qual via de sinalização intracelular (por ex., dependente de proteína G ou de β -arrestina) participa dos efeitos cardio- e neuroprotetivos dos α_{1A} -adrenoceptores e mal adaptativos dos α_{1B} -adrenoceptores. Os dados do presente trabalho mostram que alguns agonistas de α_1 -adrenoceptores apresentam preferência pela mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ ou pela internalização destes receptores; estes agonistas podem ser ferramentas úteis na investigação desses efeitos protetores ou mal adaptativos, bem como podem fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da insuficiência cardíaca e de desordens neurológicas.

Conclusões

6. Conclusões

1 - Agonistas de α_1 -adrenoceptores das classes das feniletilaminas e imidazolininas apresentam seletividade funcional:

- ao ativarem α_{1A} -adrenoceptores, a fenilefrina e o A61603 são agonistas tendenciosos para a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e a dopamina para a internalização;
- ao ativarem α_{1B} -adrenoceptores, o A61603, a oximetazolina e a nafazolina são agonistas tendenciosos para a internalização.

2 - Apesar de ambos os métodos para quantificação de agonismo tendencioso (razões de τ ou razões de τ/K_A) apresentarem perfis semelhantes de fatores de tendência, as diferenças significativas nas tendências absolutas calculadas e limitações metodológicas apontam que a determinação de razões de τ/K_A é uma estratégia mais conveniente para quantificar agonismo tendencioso.

3 – Há repercussões funcionais do agonismo tendencioso da oximetazolina em α_{1B} -adrenoceptores recombinantes humanos e nativos de rato.

4 – A forte correlação entre os valores de $\log \tau/K_A$ dos agonistas na contração do ducto deferente de rato mediada por α_{1A} -adrenoceptores nativos e na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores humanos, mas não na internalização, indica que este parâmetro pode ser usado para diferenciar as vias de sinalização disparadas pela ativação destes receptores.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Andresen BT (2011) A pharmacological primer of biased agonism. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* **11**(2): 92-98.
- Arcos D, Sierra A, Nunez A, Flores G, Aceves J and Arias-Montano JA (2003) Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors. *Neuropharmacology* **45**(8): 1070-1079.
- Arias-Montano JA, Berger VA, Soria-Jasso LE and Young JM (1999) Characterisation of alpha1B-adrenoceptors linked to inositol phosphate formation and calcium mobilisation in human astrocytoma U373 MG cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **360**(5): 533-539.
- Ariens EJ (1954) Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. I. Problems and theory. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* **99**(1): 32-49.
- Attwood TK and Findlay JB (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* **7**(2): 195-203.
- Barki-Harrington L and Rockman HA (2008) Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda)* **23**: 17-22.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* **54**(1): 94-104.
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1793**(6): 933-940.
- Besse JC and Furchgott RF (1976) Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **197**(1): 66-78.
- Black JW and Leff P (1983) Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220**(1219): 141-162.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Burt RP, Chapple CR and Marshall I (1995) Evidence for a functional alpha 1A- (alpha 1C-) adrenoceptor mediating contraction of the rat epididymal vas deferens and an alpha 1B-adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. *Br J Pharmacol* **115**(3): 467-475.
- Cervantes D, Crosby C and Xiang Y (2010) Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. *Circ Res* **106**(1): 79-88.
- Cheng Y and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**(23): 3099-3108.
- Clark AJ (1933) *The Model of Action of Drugs on Cells*. Edward Arnold & Co., London.
- Cotecchia S (2010) The alpha1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *Journal of receptor and signal transduction research* **30**(6): 410-419.
- DeFea KA (2011) Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cellular signalling* **23**(4): 621-629.
- Deupi X and Kobilka BK (2010) Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology (Bethesda)* **25**(5): 293-303.
- Ehlert FJ (2008) On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **377**(4-6): 549-577.
- Evans BA, Broxton N, Merlin J, Sato M, Hutchinson DS, Christopoulos A and Summers RJ (2011) Quantification of functional selectivity at the human alpha(1A)-adrenoceptor. *Molecular pharmacology* **79**(2): 298-307.
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M and Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews* **57**(2): 279-288.

- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG and Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**(6): 1256-1272.
- Furchgott RF (1966) *The use of β -haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes.* . Academic Press, New York.
- Galandrin S and Bouvier M (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* **70**(5): 1575-1584.
- Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J and del Carmen Medina L (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* **389**(1): 1-12.
- Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D and Johnson I (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* **27**(2): 97-106.
- Gesty-Palmer D and Luttrell LM (2011) Refining efficacy: exploiting functional selectivity for drug discovery. *Adv Pharmacol* **62**: 79-107.
- Giraldo J (2004) Agonist induction, conformational selection, and mutant receptors. *FEBS letters* **556**(1-3): 13-18.
- Griffin MT, Figueroa KW, Liller S and Ehlert FJ (2007) Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M2 muscarinic receptor signaling through Gi/o, Gs, and G15. *J Pharmacol Exp Ther* **321**(3): 1193-1207.
- Hall RA and Lefkowitz RJ (2002) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res* **91**(8): 672-680.
- Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB and Schubert C (2001) Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* **9**(9): 869-880.
- Hein P and Michel MC (2007) Signal transduction and regulation: are all alpha1-adrenergic receptor subtypes created equal? *Biochem Pharmacol* **73**(8): 1097-1106.

- Heitzler D, Durand G, Gallay N, Rizk A, Ahn S, Kim J, Violin JD, Dupuy L, Gauthier C, Piketty V, Crepieux P, Poupon A, Clement F, Fages F, Lefkowitz RJ and Reiter E (2012) Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and beta-arrestin signaling. *Molecular systems biology* **8**: 590.
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP and Ruffolo RR, Jr. (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacological reviews* **47**(2): 267-270.
- Jensen BC, O'Connell TD and Simpson PC (2011) Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **51**(4): 518-528.
- Johannssen V, Maune S, Werner JA, Rudert H and Ziegler A (1997) Alpha 1-receptors at pre-capillary resistance vessels of the human nasal mucosa. *Rhinology* **35**(4): 161-165.
- Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y and Takezako T (2003) Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol Metab* **14**(9): 431-437.
- Katritch V, Cherezov V and Stevens RC (2012) Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* **33**(1): 17-27.
- Kenakin T (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**(4): 186-192.
- Kenakin T (2011) Functional selectivity and biased receptor signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **336**(2): 296-302.
- Kenakin T and Christopoulos A (2011) Analytical pharmacology: the impact of numbers on pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* **32**(4): 189-196.
- Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A and Novick S (2012) A Simple Method for Quantifying Functional Selectivity and Agonist Bias. *Acs Chem Neurosci* **3**(3): 193-203.
- Kenakin TP (2009) 7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins. *Trends Pharmacol Sci* **30**(9): 460-469.

- Kendall RT, Strungs EG, Rachidi SM, Lee MH, El-Shewy HM, Luttrell DK, Janech MG and Luttrell LM (2011) The beta-arrestin pathway-selective type 1A angiotensin receptor (AT1A) agonist [Sar1,Ile4,Ile8]angiotensin II regulates a robust G protein-independent signaling network. *J Biol Chem* **286**(22): 19880-19891.
- Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, Conner DA and Lefkowitz RJ (2001) beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(4): 1601-1606.
- Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**(1): 1-7.
- Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J and Tsujimoto G (2003) Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol Ther* **98**(2): 235-244.
- Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE and Sigler PB (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**(6563): 311-319.
- Langeloh A and Jurkiewicz A (1982) Analysis of the effects of dopamine and noradrenaline in relation to the proposed postsynaptic dopamine receptor in rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **318**(3): 202-209.
- Leff P (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* **16**(3): 89-97.
- Liao CH, Guh JH, Chueh SC and Yu HJ (2011) Anti-angiogenic effects and mechanism of prazosin. *Prostate* **71**(9): 976-984.
- Lima V, Mueller A, Kamikihara SY, Raymundi V, Alewood D, Lewis RJ, Chen Z, Minneman KP and Pupo AS (2005) Differential antagonism by conotoxin rho-TIA of contractions mediated by distinct alpha1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *Eur J Pharmacol* **508**(1-3): 183-192.
- Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science* **115**(Pt 3): 455-465.

- Marshall I, Burt RP and Chapple CR (1999) Signal transduction pathways associated with alpha1-adrenoceptor subtypes in cells and tissues including human prostate. *Eur Urol* **36 Suppl 1**: 42-47; discussion 65.
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP and Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**(5): 551-577.
- Michelotti GA, Price DT and Schwinn DA (2000) Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther* **88**(3): 281-309.
- Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C and Esbenshade TA (1994) Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Molecular pharmacology* **46**(5): 929-936.
- Morris AJ and Malbon CC (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* **79**(4): 1373-1430.
- Noor N, Patel CB and Rockman HA (2011) Beta-arrestin: a signaling molecule and potential therapeutic target for heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **51**(4): 534-541.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG and Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**(22): 17201-17210.
- Oldham WM and Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**(1): 60-71.
- Overington JP, Al-Lazikani B and Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**(12): 993-996.
- Perez DM and Doze VA (2011) Cardiac and neuroprotection regulated by alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* **31**(2): 98-110.
- Poot M, Hudson FN, Grossmann A, Rabinovitch PS and Kavanagh TJ (1996) Probenicid inhibition of fluorescence extrusion after MCB-staining of rat-1 fibroblasts. *Cytometry* **23**(1): 78-81.

- Pupo AS (1998) Functional effects of castration on alpha1-adrenoceptors in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* **351**(2): 217-223.
- Pupo AS and Minneman KP (2003) Specific interactions between gC1qR and alpha1-adrenoceptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* **23**(2-3): 185-195.
- Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, Dewire SM, Violin JD and Lefkowitz RJ (2011) Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Molecular pharmacology* **80**(3): 367-377.
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK and Lefkowitz RJ (2012) Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**: 179-197.
- Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Freneau RT, Jr., Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ and Cotecchia S (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem* **265**(14): 8183-8189.
- Shelley C and Cull-Candy SG (2010) Desensitization and models of receptor-channel activation. *The Journal of physiology* **588**(Pt 9): 1395-1397.
- Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2011) beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* **32**(9): 521-533.
- Shukla AK, Xiao K and Lefkowitz RJ (2011) Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends in biochemical sciences* **36**(9): 457-469.
- Sica DA (2005) Alpha1-adrenergic blockers: current usage considerations. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **7**(12): 757-762.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH and Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365**(6442): 170-175.
- Stephenson RP (1956) A modification of receptor theory. *British journal of pharmacology and chemotherapy* **11**(4): 379-393.

- Stewart JM, Munoz J and Weldon A (2002) Clinical and physiological effects of an acute alpha-1 adrenergic agonist and a beta-1 adrenergic antagonist in chronic orthostatic intolerance. *Circulation* **106**(23): 2946-2954.
- Tschammer N, Bollinger S, Kenakin T and Gmeiner P (2011) Histidine 6.55 is a major determinant of ligand-biased signaling in dopamine D2L receptor. *Molecular pharmacology* **79**(3): 575-585.
- Vaidehi N and Kenakin T (2010) The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. *Current opinion in pharmacology* **10**(6): 775-781.
- Vicentic A, Robeva A, Rogge G, Uberti M and Minneman KP (2002) Biochemistry and pharmacology of epitope-tagged alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **302**(1): 58-65.
- Warde N (2011) BHP: Silodosin an effective new drug for BPH-associated LUTS. *Nat Rev Urol* **8**(1): 8.
- Whalen EJ, Rajagopal S and Lefkowitz RJ (2011) Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* **17**(3): 126-139.
- Xiao L, Pimental DR, Amin JK, Singh K, Sawyer DB and Colucci WS (2001) MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**(4): 779-787.
- Yang-Feng TL, Han H, Lomasney JW and Caron MG (1994) Localization of the cDNA for an alpha 1-adrenergic receptor subtype (ADRA1D) to chromosome band 20p13. *Cytogenetics and cell genetics* **66**(3): 170-171.
- Yang-Feng TL, Xue FY, Zhong WW, Cotecchia S, Frielle T, Caron MG, Lefkowitz RJ and Francke U (1990) Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(4): 1516-1520.
- Zheng H, Loh HH and Law PY (2010) Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. *IUBMB life* **62**(2): 112-119.
- Zhong H and Minneman KP (1999) Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **375**(1-3): 261-276.

Apêndice

Apêndice A – Como calcular o agonismo tendencioso com o software GraphPad Prism

Este tutorial explica a aplicação do Modelo Operacional (Black e Leff, 1983) para quantificar o agonismo tendencioso de ligantes em duas vias de sinalização diferentes no software GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Nessa quantificação é utilizado o método proposto por Kenakin *et al.* (2012), baseado na razão de transdução ou razão de τ/K_A determinada pela equação do Modelo Operacional reparametrizada (Evans *et al.*, 2011):

$$Resposta = basal + \frac{(E_{max} - basal) \times TR^n \times [A]^n}{[A]^n \times TR^n \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^n}$$

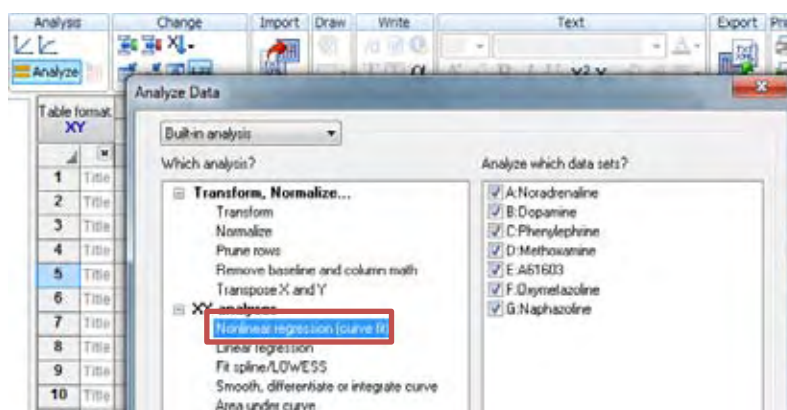
Passo 1: Inserir os dados das curvas concentração-resposta para agonistas obtidos em ensaios diferentes em tabelas separadas do tipo XY (*Data tables*). O agonista de referência deve estar na coluna A. Os valores inseridos em X devem estar como log da concentração do agonista.



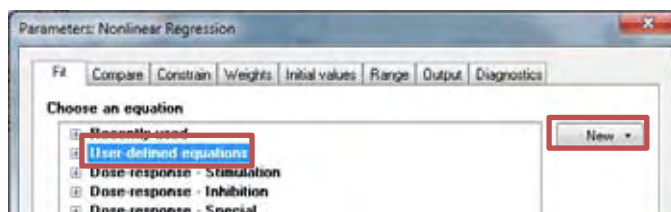
Passo 2: Abra a primeira tabela e clique em analisar (*Analyse*).



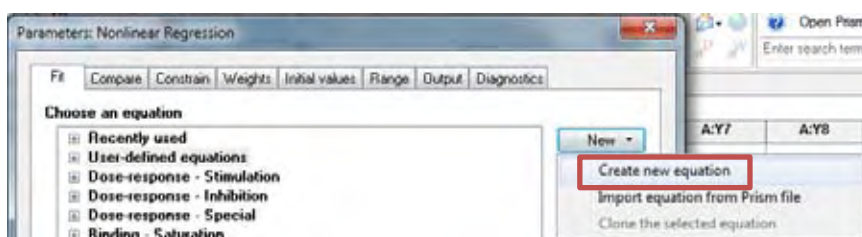
Passo 3: Uma janela será aberta e nas análises XY (XY Analyses), clique em regressão não-linear (*Nonlinear regression*).



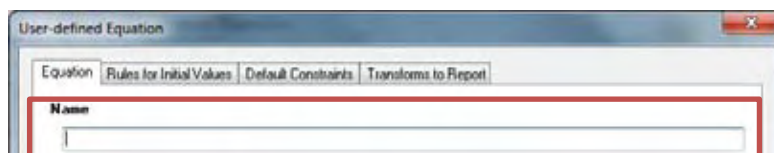
Passo 4: Clique em Equações definidas pelo usuário (*User-defined equations*), e à seguir, clique em Nova (*New*).



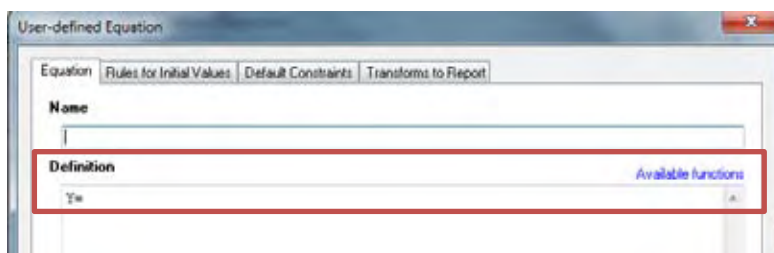
Passo 5: Clique em Criar nova equação (*Create new equation*).



Passo 6: Na janela que será aberta, dê um nome (*Name*) para a nova equação. Por exemplo, *Operational Model with TauKa Ratios*.



Passo 7: Nesta mesma janela, insira as definições das equações (*Definition*). Neste exemplo, são mostradas as equações para 7 drogas, cada uma em uma coluna diferente (de A a G), dependendo do número de drogas testadas, remova as equações correspondentes ou acrescente.



$A=10^X$

$operate1=((1+A/(10^{\log KA1}))/((10^{\log R1})^A))^n$

$operate2=((1+A/(10^{\log KA2}))/((10^{\log R2})^A))^n$

$operate3=((1+A/(10^{\log KA3}))/((10^{\log R3})^A))^n$

$operate4=((1+A/(10^{\log KA4}))/((10^{\log R4})^A))^n$

$operate5=((1+A/(10^{\log KA5}))/((10^{\log R5})^A))^n$

$operate6=((1+A/(10^{\log KA6}))/((10^{\log R6})^A))^n$

$operate7=((1+A/(10^{\log KA7}))/((10^{\log R7})^A))^n$

<A>Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate1)

Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate2)

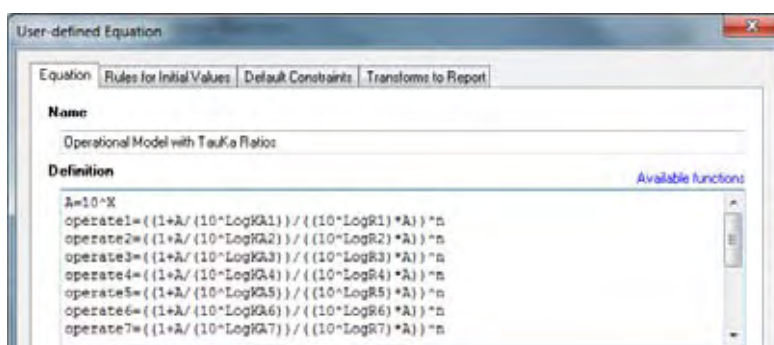
<C>Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate3)

<D>Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate4)

<E>Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate5)

<F>Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate6)

<G>Y=basal+(Emax-basal)/(1+operate7)



Onde,

X: é o log da concentração do agonista

Y: é a resposta do agonista

E_{max}: resposta máxima possível do sistema

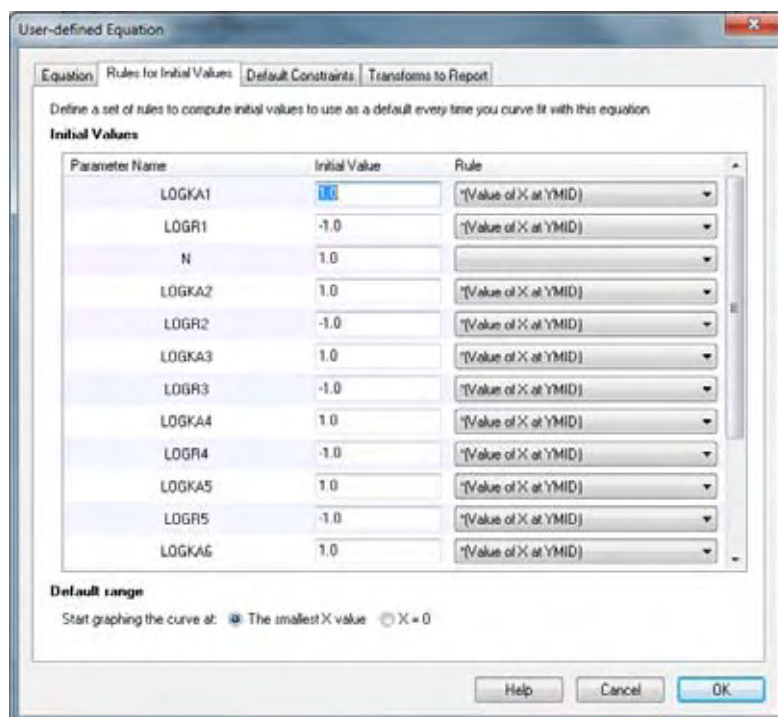
n: inclinação de transdução sem unidade

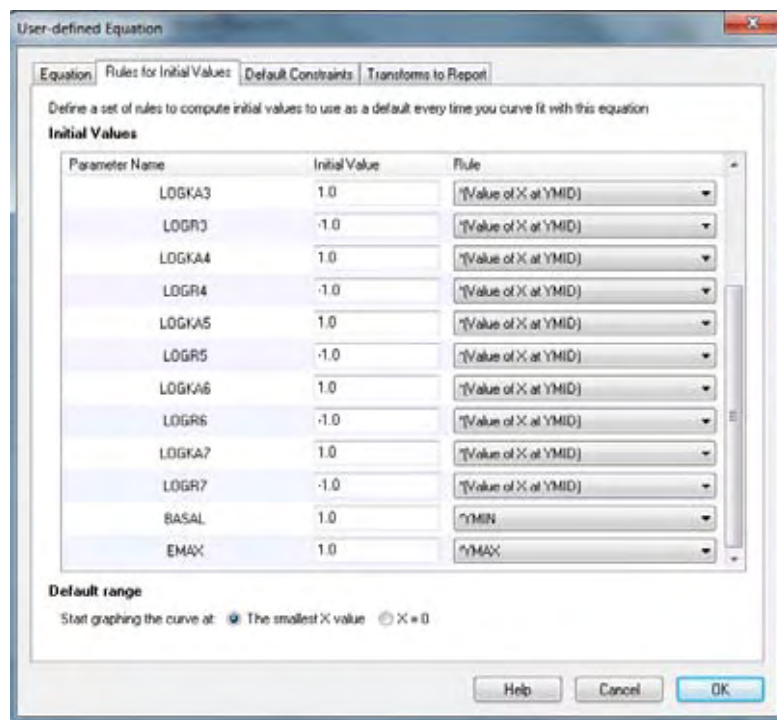
Basal: resposta na ausência do agonista, na mesma unidade de Y

logK_A: log da constante de dissociação do agonista, na mesma unidade de X

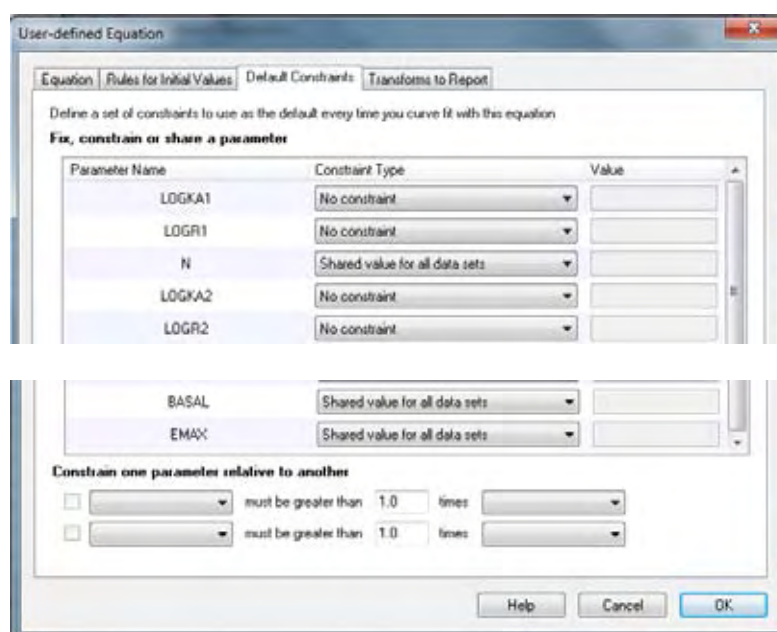
logR ou log TR: log da razão da razão de transdução ou $\log(\tau/K_A)$

Passo 8: Clique na aba Regras para os valores iniciais (*Rules for Initial Values*). E insira os valores iniciais (*Initial Values*) de 1.0 para todos os logK_A e escolha a regra (*Rules*) *(Value of X at YMID). Para todos os logR o valor inicial de -1.0 e escolha a regra *(Value of X at YMID). O valor inicial de N é 1.0. Para o basal, coloque o valor inicial 1.0 e a regra *YMIN e o EMAX, 1.0 e a regra *YMAX.





Passo 9. Clique na aba Restrição padrão (*Default constraint*) e mantenha todos os LogKA e LogR1 sem restrição (*No constraint*). Os valores de N, o BASAL e o EMAX devem ser compartilhados para todos os conjuntos de dados (*Shared value for all data sets*).



Passo 10: Caso a análise dê ambíguo (*Ambiguous*), isso ocorre devido a um loop ou bug do template, há a necessidade de se restringir o logKA de uma das drogas a um

valor. Por exemplo, coloque -3.0 (não importa o valor que não altera os valores de logR das drogas testadas).

Nonlin fit		A	B	C	D	E	F
		Noradrenaline	Dopamine	Phenylephrine	Methoxamine	A61603	Oxymetazoline
1	Operational Model with TauKa Ratios	Ambiguous	Ambiguous	Ambiguous	Ambiguous	Ambiguous	Ambiguous
2	Best-fit values						
3	LOGKA1	~ -8.039	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)
4	LOGR1	~ 7.529	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)
5	N	~ 1.253	~ 1.253	~ 1.253	~ 1.253	~ 1.253	~ 1.253
6	LOGKA2	(not used)	~ -5.517	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)
7	LOGR2	(not used)	~ 4.968	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)

Não há uma regra para qual droga deve ter o seu logKA restrito, neste caso todas as colunas devem ser testadas até que o programa consiga analisar sem sair ambíguo.

Nonlin fit		A	B	C	D	E	F	G	H
		Noradrenaline	Dopamine	Phenylephrine	Methoxamine	A61603	Oxymetazoline	Naphazoline	Global (shared)
1	Operational Model with TauKa Ratios	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Best-fit values								
3	LOGKA1	-5.638	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
4	LOGR1	7.990	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
5	N	1.044	1.044	1.044	1.044	1.044	1.044	1.044	1.044
6	LOGKA2	(not used)	-4.458	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
7	LOGR2	(not used)	5.430	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
8	LOGKA3	(not used)	(not used)	-6.400	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
9	LOGR3	(not used)	(not used)	7.213	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
10	LOGKA4	(not used)	(not used)	(not used)	-5.908	(not used)	(not used)	(not used)	
11	LOGR4	(not used)	(not used)	(not used)	6.866	(not used)	(not used)	(not used)	
12	LOGKA5	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	= -3.000	(not used)	(not used)	
13	LOGR5	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	9.671	(not used)	(not used)	
14	LOGKA6	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	-7.974	(not used)	
15	LOGR6	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	7.990	(not used)	
16	LOGKA7	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	-7.290	
17	LOGR7	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	7.499	
18	BASAL	0.2912	0.2912	0.2912	0.2912	0.2912	0.2912	0.2912	0.2912
19	EMAX	97.92	97.92	97.92	97.92	97.92	97.92	97.92	97.92
20	Std. Error								
21	LOGKA1	4.104	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
22	LOGR1	0.05341	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
23	N	0.09112	0.09112	0.09112	0.09112	0.09112	0.09112	0.09112	0.09112
24	LOGKA2	(not used)	0.3197	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
25	LOGR2	(not used)	0.07647	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	
26	LOGKA3	(not used)	(not used)	0.2170	(not used)	(not used)	(not used)	(not used)	

Passo 11: Faça a mesma análise descrita anteriormente para o segundo ensaio.

Passo 12: Copie todos os valores de log R e seus respectivos erros padrão para uma tabela.

Calcio A			
	log (τ/K_A)	epm	
Nor	7,99	0,05	
Dopa	5,43	0,08	
Fenil	7,21	0,08	
Metox	6,87	0,08	
A61603	9,67	0,06	
Oxi	7,99	0,14	
Nfz	7,50	0,11	

Internaliz A			
	log (τ/K_A)	epm	
Nor	9,85	0,32	
Dopa	9,90	0,33	
Fenil	6,90	0,50	
Metox	8,45	0,37	
A61603	8,28	0,41	
Oxi	9,85	0,34	
Nfz	8,23	0,49	

Passo 13: Para cada agonista testado faça a diferença dos seus valores de log (τ/K_A) ou logR e o valor de log (τ/K_A) do agonista de referência, no exemplo, a noradrenalina.

Calcio A				Calcio A			
	log (τ/K_A)	epm		$\Delta \log (\tau/K_A)$	epm		
Nor	7,99	0,05		0,00	0,08		
Dopa	5,43	0,08	$5,43 - 7,99 = -2,56$	-2,56	0,09		
Fenil	7,21	0,08		-0,78	0,10		
Metox	6,87	0,08		-1,12	0,10		
A61603	9,67	0,06		1,68	0,08		
Oxi	7,99	0,14		0,00	0,15		
Nfz	7,50	0,11		-0,49	0,13		

Internaliz A				Internaliz A			
	log (τ/K_A)	epm		$\Delta \log (\tau/K_A)$	epm		
Nor	9,85	0,32		0,00	0,45		
Dopa	9,90	0,33	$9,85 - 9,90 = 0,04$	0,04	0,46		
Fenil	6,90	0,50		-2,96	0,59		
Metox	8,45	0,37		-1,40	0,48		
A61603	8,28	0,41		-1,57	0,52		
Oxi	9,85	0,34		0,00	0,46		
Nfz	8,23	0,49		-1,62	0,58		

Passo 14: Para cada agonista testado calcule o erro padrão resultante como a raiz quadrada da soma dos quadrados ($\sqrt{(epm_{\text{agonista}})^2 + (epm_{\text{referência}})^2}$).

Calcio A				Calcio A			
		log (τ/K_A)	epm		$\Delta \log (\tau/K_A)$		epm
Nor	7,99	0,05	$\sqrt{(0,08)^2 + (0,35)^2}$ =0,09			0,08	
Dopa	5,43	0,08				0,09	
Fenil	7,21	0,08				0,10	
Metox	6,87	0,08				0,10	
A61603	9,67	0,06				0,08	
Oxi	7,99	0,14			0,00	0,15	
Nfz	7,50	0,11			-0,49	0,13	
Internaliz A				Internaliz A			
		log (τ/K_A)	epm		$\Delta \log (\tau/K_A)$		epm
Nor	9,85	0,32	$\sqrt{(0,33)^2 + (0,32)^2}$ =0,46			0,45	
Dopa	9,90	0,33				0,46	
Fenil	6,90	0,50				0,59	
Metox	8,45	0,37				0,48	
A61603	8,28	0,41				0,52	
Oxi	9,85	0,34			0,00	0,46	
Nfz	8,23	0,49			-1,62	0,58	

Passo 15: Para cada agonista testado calcule o $\Delta \log \tau/K_A$ como a diferença entre o $\Delta \log (\tau/K_A)$ das duas vias de sinalização.

Calcio A			Calcio - Internaliz.		
$\Delta \log (\tau/K_A)$	epm		$\Delta \log TR$	epm	
0,00	0,08		0,00	0,45	
-2,56	0,09		-2,61	0,47	
-0,78	0,10		2,18	0,60	
-1,12	0,10		0,28	0,49	
1,68	0,08		3,25	0,52	
0,00	0,15		0,00	0,49	
-0,49	0,13		1,13	0,60	
Internaliz A					
$\Delta \log (\tau/K_A)$	epm				
0,00	0,45				
0,04	0,46				
-2,96	0,59				
-1,40	0,48				
-1,57	0,52				
0,00	0,46				
-1,62	0,58				

0 - 0 = 0

-2,56 - 0,04 = -2,61

-0,78 - (-2,96) = 2,18

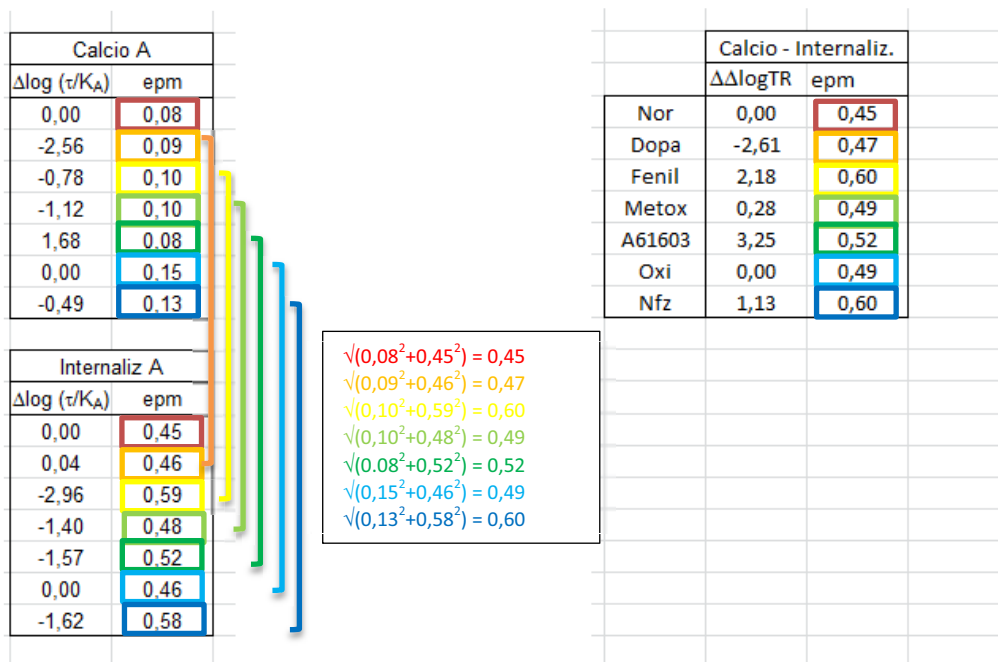
-1,12 - (-1,40) = 0,28

1,68 - (-1,57) = 3,25

0 - 0 = 0

-0,49 - (-1,62) = 1,13

Passo 16: Para cada agonista testado calcule o erro padrão resultante como a raiz quadrada da soma dos quadrados ($\sqrt{(epm_{\text{agonista}})^2 + (epm_{\text{referência}})^2}$).



Resultado final:

	α_{1A} -adrenoceptores				
	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$	Internalização	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i$	Internalização	Fator de tendência
	$\log(\tau/K_A)$	$\log(\tau/K_A)$	$\Delta \log(\tau/K_A)$	$\Delta \log(\tau/K_A)$	$\Delta \Delta \log(\tau/K_A)$
Noradrenalina	7.99 ± 0.05	9.85 ± 0.32	0.00 ± 0.08	0.00 ± 0.45	0.00 ± 0.45
Dopamina	5.43 ± 0.08	9.90 ± 0.33	-2.66 ± 0.09	0.05 ± 0.46	-2.68 ± 0.47
Fenilefrina	7.21 ± 0.08	6.90 ± 0.50	0.78 ± 0.10	-2.96 ± 0.59	2.13 ± 0.60
Metoxamina	6.87 ± 0.08	8.45 ± 0.37	-1.12 ± 0.10	-1.40 ± 0.48	0.22 ± 0.49
A61603	9.67 ± 0.06	8.29 ± 0.41	1.68 ± 0.08	-1.57 ± 0.52	3.03 ± 0.52
Oximetazolina	7.99 ± 0.14	9.85 ± 0.34	0.00 ± 0.15	-0.01 ± 0.46	-0.69 ± 0.49
Nafazolina	7.50 ± 0.11	8.23 ± 0.49	-0.49 ± 0.13	-1.62 ± 0.59	0.72 ± 0.60

Valores estão representados como a média $\pm$ epm dos agonista testados.

Referências Bibliográficas:

Black JW and Leff P (1983) Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220**(1219): 141-162.

Evans BA, Broxton N, Merlin J, Sato M, Hutchinson DS, Christopoulos A and Summers RJ (2011) Quantification of functional selectivity at the human alpha(1A)-adrenoceptor. *Molecular Pharmacology* **79**(2): 298-307.

Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A and Novick S (2012) A Simple Method for Quantifying Functional Selectivity and Agonist Bias. *Acs Chem Neurosci* **3**(3): 193-203.

Apêndice B – Curvas concentração-resposta de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e Internalização de α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores

As Figuras A1 e A2 mostram curvas concentração-resposta para cada um dos agonistas utilizados das classes das feniletilaminas e das imidazolininas em dois ensaios diferentes, o de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e o de internalização para α_{1A} -adrenoceptores e α_{1B} -adrenoceptores, respectivamente. Essas curvas foram utilizadas para a comparação equimolar, onde os dados dos dois ensaios com um único agonista nas mesmas concentrações foram confrontados para criar um gráfico de tendência (*bias plot*) para α_{1A} -adrenoceptores (Figura 18A) e α_{1B} -adrenoceptores (Figura 18B).

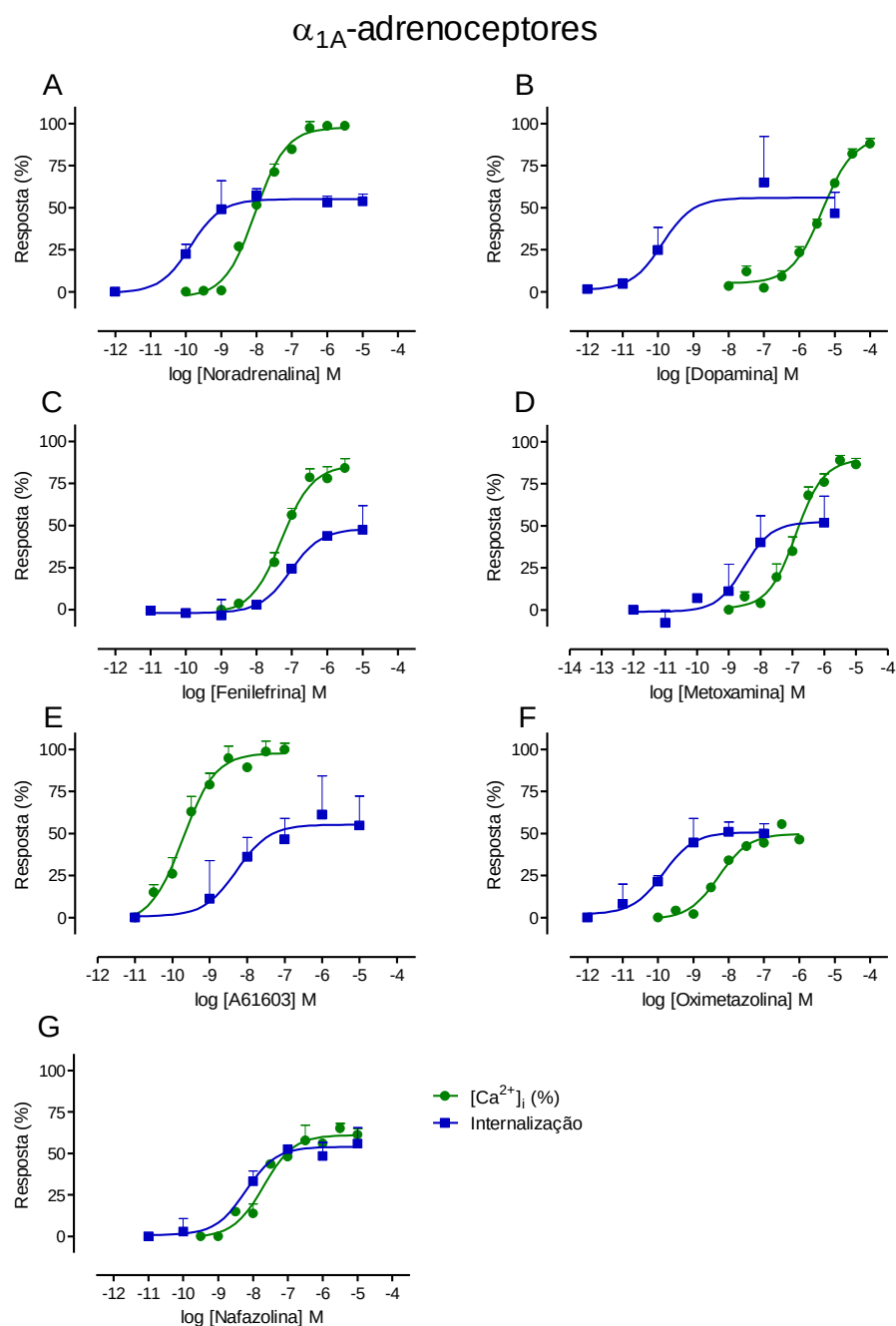


Figura A1. Comparação equimolar das curvas concentração-resposta para os agonistas de α_1 -adrenoceptores (feniletilaminas noradrenalina (A), dopamina (B), fenilefrina (C), metoxamina (D) e as imidazolinas A61603 (E), oximetazolina (F) e nafazolina (G)) em células HEK293 expressando α_{1A} -adrenoceptores em ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização. Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos.

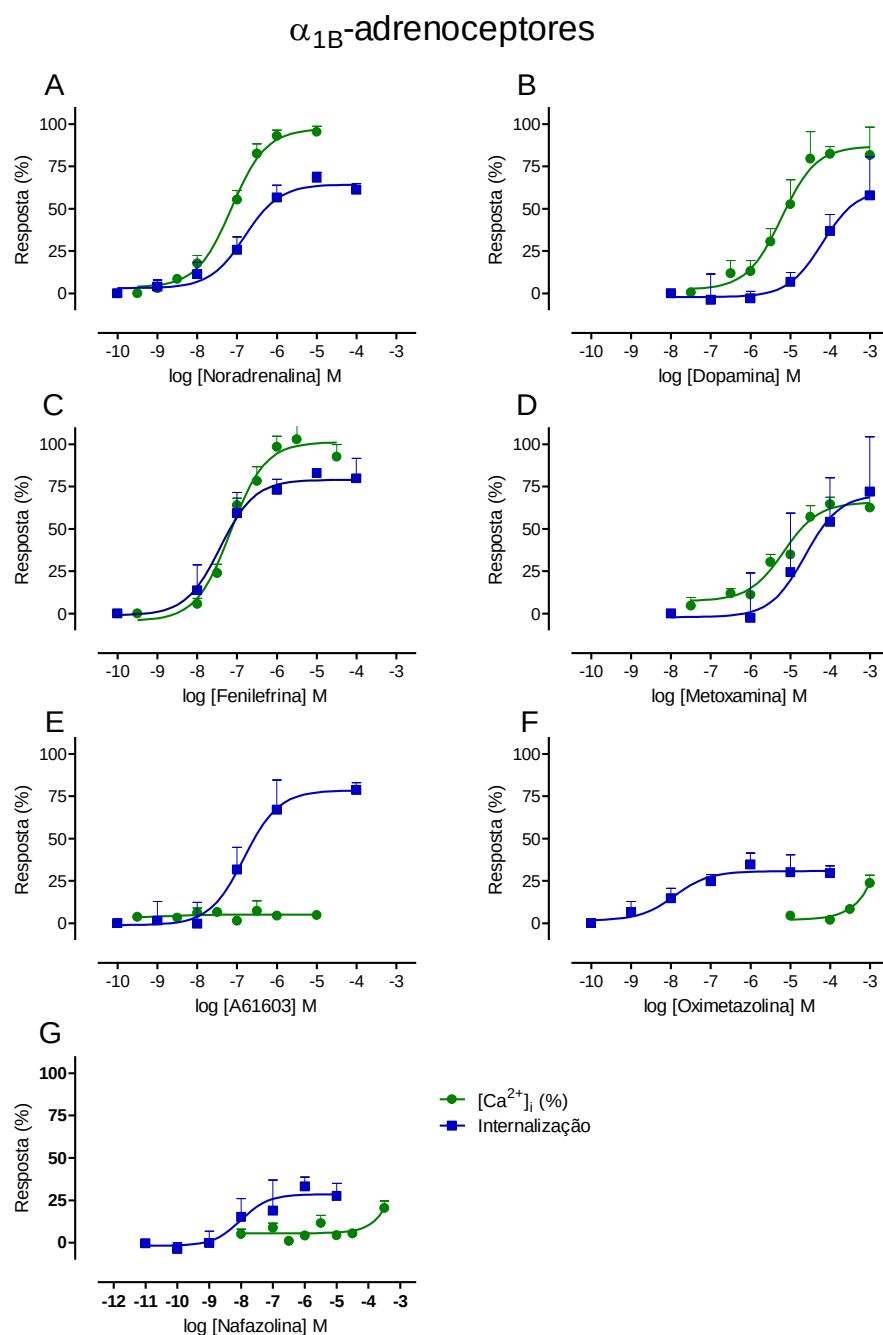


Figura A2. Comparação equimolar das curvas concentração-resposta para os agonistas de α_1 -adrenoceptores (feniletilaminas noradrenalina (A), dopamina (B), fenilefrina (C), metoxamina (D) e as imidazolinas A61603 (E), oximetazolina (F) e nafazolina (G)) em células HEK293 expressando α_{1B} -adrenoceptores em ensaios de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e de internalização. Cada símbolo representa a média e a linha vertical quando maior que o símbolo representa o e.p.m. de 3 a 4 experimentos.

**Apêndice C – Comparação $\Delta\log(\tau K_A)$ de internalização
com $[Ca^{2+}]_i$, cAMP e ECAR de Evans et al. (2011) em α_{1A} -
adrenoceptores humanos recombinantes**

A Tabela A1 mostra o coeficiente de transdução normalizado ($\Delta\log(\tau K_A)$) para agonistas em α_{1A} -adrenoceptores humanos recombinantes na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, cAMP, ECAR e internalização, obtidos por Evans et al. (2011) e pelo presente trabalho. Os fatores de tendência ($\Delta\log(\tau K_A)$) apresentados na Tabela A2 foram obtidos a partir dos valores mostrados na Tabela A1.

Tabela A1. Coeficiente de transdução normalizado $\Delta\log(\tau K_A)$ para agonistas em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoceptores humanos recombinantes.

	α_{1A} -adrenoceptores			
	Mobilização de $[Ca^{2+}]_i^a$	cAMP ^a	ECAR ^a	Internalização
	$\Delta\log(\tau K_A)$	$\Delta\log(\tau K_A)$	$\Delta\log(\tau K_A)$	$\Delta\log(\tau K_A)$
Noradrenalina	0.00 ± 0.19	0.00 ± 0.16	0.00 ± 0.18	0.00 ± 0.45
Fenilefrina	-0.52 ± 0.20	-0.72 ± 0.18	0.79 ± 0.18	-2.96 ± 0.59
Metoxamina	-1.22 ± 0.18	-1.21 ± 0.18	-0.61 ± 0.18	-1.40 ± 0.48
A61603	1.12 ± 0.20	2.06 ± 0.16	0.98 ± 0.19	-1.57 ± 0.52
Oximetazolina	0.06 ± 0.21	n.d	1.55 ± 0.19.	-0.01 ± 0.46

Valores estão representados como a média ± epm dos agonista testados; n.d.: não determinado. ^aDados de coeficiente de transdução normalizado $\Delta\log(\tau K_A)$ obtidos por Evans et al. (2010).

$$\Delta\log(\tau K_A)_{\text{agonista/referência}} = \Delta\log(\tau K_A)_{\text{agonista}} - \Delta\log(\tau K_A)_{\text{referência}}$$

Tabela A2. Fator de tendência ($\Delta\log(\tau/K_A)$) para agonistas em α_{1A} - e α_{1B} -adrenoreceptores humanos recombinantes.

	α_{1A} -adrenoreceptores					
	cAMP - $[Ca^{2+}]^a$	ECAR - cAMP ^a	ECAR - $[Ca^{2+}]^a$	$[Ca^{2+}]^i$ - Internalização	cAMP - internalização	ECAR - Internalização
	$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$
Noradrenalina	0.00 ± 0.25	0.00 ± 0.24	0.00 ± 0.26	0.00 ± 0.49	0.00 ± 0.48	0.00 ± 0.48
Fenilefrina	-0.20 ± 0.27	1.52 ± 0.26***	1.31 ± 0.27**	2.44 ± 0.62*	2.24 ± 0.62*	3.75 ± 0.62**
Metoxamina	0.01 ± 0.26	0.60 ± 0.25*	0.61 ± 0.26	0.18 ± 0.52	0.19 ± 0.51	0.79 ± 0.51
A61603	0.94 ± 0.26*	-0.51 ± 0.25	0.43 ± 0.28	2.69 ± 0.56	3.63 ± 0.54**	3.12 ± 0.55*
Oximetazolina	n.d.	n.d.	0.91 ± 0.28*	0.07 ± 0.51	n.d.	0.99 ± 0.50

Valores estão representados como a média ± epm dos agonista testados; n.d.: não determinado. O símbolo * representa diferença estatística dos agonistas em relação ao agonista de referência noradrenalina (teste *t* de Student não pareado, *p<0.05).

$$\Delta\log(\tau/K_A) = \log(\tau/K_A)_{\text{via de sinalização 1}} - \log(\tau/K_A)_{\text{via de sinalização 2}}$$