

Produção de lisado hepático de ratos Wistar para análise de capacidade de metabolização de CYP3A

Helen Ruth Ferreira Costa¹(IC)*, Caroline Rego Rodrigues¹(PQ).

1 Universidade Estadual de Goiás. Campus Ceres. Rua Lucas Marcelino dos Santos Qd. 34 Lt. 3. Bairro: Setor Curumim, CEP: 76300-000, Ceres – GO, Brasil.

* hellen_rutty14@hotmail.com

Para testar a viabilidade de novos protótipos de fármacos, deve-se avaliar, dentre outras, a sua capacidade de causar interação medicamentosa com outros fármacos. As interações farmacológicas na fase de biotransformação são muito comuns e podem ser causadas por substâncias que inibem enzimas CYP450 aumentando a biodisponibilidade de fármacos metabolizados pela subfamília inibida. O objetivo deste trabalho é produzir um concentrado de enzimas microsossomais viáveis a partir de tecido hepático extraído de ratos Wistar. 6 ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e seus fígados extraídos cirurgicamente. A massa hepática foi triturada e sofreu centrifugações sucessivas até a obtenção do lisado contendo as enzimas microsossomais. A quantidade de proteínas totais foi determinada pelo método de biureto. O lisado foi aliquotado em eppendorf® e armazenado em nitrogênio líquido. O procedimento gerou 18 mL de lisado contendo 6,7 mg/mL de proteínas totais, quantidade superior a outros protocolos de extração de enzimas hepáticas. Este lisado será útil para o desenvolvimento de testes de atividade enzimática de subfamílias CYP450. Sabe-se que a subfamília CYP3A metaboliza midazolam, dessa forma, ao se montar um meio reacional contendo lisado + NADPH + midazolam espera-se que as enzimas CYP3A presentes no lisado sejam capazes de metabolizar o midazolam.

Palavras-chave: Enzimas microsossomais. Citocromo P450. Inibição enzimática.

Introdução

O metabolismo ou biotransformação pode ser conceituado como a transformação do fármaco em outra substância química derivada deste, chamada metabólito. Para que esse processo ocorra, estão envolvidas diversas enzimas que juntas são responsáveis pelas reações de Fase 1 (oxidação, redução e hidrólise) e de Fase 2 (conjugação) (DE LUCIA; OLIVEIRA-FILHO, 2004).

Nas reações de fase 1 predominam as enzimas microsossomais e os fármacos são transformados em moléculas mais polares e mais reativas. Nas reações de fase 2 predominam as enzimas citosólicas e um grupo mais polar (aminoácidos, metila,

acetila, sulfato, glicuronídeo ou glutatona) se conjuga ao metabólito de fase 1 tornando-o mais estável e hidrossolúvel (OLSON, 2002).

O citocromo P450 pode ser induzido ou inibido por diversas substâncias (outros fármacos, drogas, alimentos) e isto pode se tornar a razão de uma interação farmacológica. A co-administração de um determinado fármaco pode aumentar ou diminuir a biodisponibilidade do primeiro, ao induzir ou inibir a família de enzimas responsáveis pela metabolização deste (OGA et al., 2002).

O órgão que concentra a maior quantidade de enzimas biotransformadoras de fármacos é o fígado; sabe-se que é possível selecionar determinada classe enzimática de acordo com seu peso molecular por meio de sucessivas centrifugações e assim obter um concentrado de enzimas ativas capazes de metabolizar seu substrato em condições ótimas de ação in vitro (LI et al., 2010).

Este trabalho se justifica pela necessidade da utilização de um fonte de enzimas para a determinação da influência de certas drogas em sua ação. A produção de extratos de enzimas microssomais provenientes de fígado de ratos Wistar é o principal protocolo de fornecimento de enzimas para testes de inibição de novas drogas (OLIVEIRA et al., 2015).

O objetivo deste trabalho é produzir um concentrado de enzimas microssomais viáveis a partir de tecido hepático extraído de ratos Wistar.

Material e Métodos

A utilização de animais (*Rattus norvegicus albinus* linhagem Wistar) por este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG) sob o nº 042/2013.

Material: Tecido hepático previamente extraído, tampão Tris/KCl 0,02 M/0,2 M pH 7,4 gelado, tampão fosfato de sódio 0,1 M gelado, EDTA, ditioneitol, glicerol, centrífuga refrigerada, falcons de 50 mL, bastão de vidro, balança de precisão, kit de determinação de proteínas totais por biureto, nitrogênio líquido.

Procedimento: 6 ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e imediatamente tiveram o sangue removido por punção cardíaca. Em seguida, os fígados foram retirados por procedimento cirúrgico e pesados em balança semi-analítica. Esses órgãos foram lavados com tampão Tris/KCl 0,02 M/0,2 M pH 7,4 a 4 °C até ficarem esbranquiçados e posteriormente foram triturados com bastão de

vidro. A massa hepática foi então centrifugada a 9000 g, 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 22.200 g por 80 minutos sendo este sobrenadante ressuspensionado em 5 mL de tampão Tris/KCl e mais uma vez centrifugado para remover a hemoglobina. Os microssomas obtidos foram aliquotados em 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 0,8 mM de EDTA, 1 mM de ditioneitol e 20% de glicerol. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C. As proteínas totais foram determinadas utilizando o método de biureto e o lisado contendo as enzimas hepáticas foi armazenado em nitrogênio líquido.

Resultados e Discussão

O lisado produzido a partir de 6 fígados de ratos Wistar (peso médio $\pm$ 18,5 g/fígado) apresentou aspecto rosado e semi-sólido. A massa hepática extraída possibilitou a produção de 18 mL de lisado que foram aliquotados em 12 eppendorfs® em nitrogênio líquido.

O lisado hepático preparado apresentou uma quantidade de proteínas totais de 6,7 mg/mL quantificado por método do biureto. Este resultado demonstra que a quantidade de proteínas no lisado foi superior a outros estudos que encontraram concentrações de 0,2 mg/mL (QIAO et al., 2014), 0,5 mg/mL (MIKASA et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2003), 2,0 mg/mL (PEKTHONG et al., 2009), 4,0 mg/mL (USIA et al., 2005) e 5,57 mg/mL (OLIVEIRA et al., 2015).

Este lisado é útil para o desenvolvimento de testes de atividade enzimática de subfamílias CYP450 quando se adiciona, ao contato com as enzimas, fármacos substratos específicos para cada subfamília. Sabe-se que a subfamília CYP3A metaboliza midazolam (FDA, 2011), dessa forma, ao se montar um meio reacional contendo lisado + NADPH + midazolam espera-se que as enzimas CYP3A presentes no lisado sejam capazes de metabolizar o midazolam. Pode-se ainda adicionar a este meio alguma outra droga e avaliar se esta tem capacidade de inibir as enzimas CYP3A ao se mensurar a quantidade de midazolam metabolizado. Dessa forma, pode-se prever se uma droga, ou protótipo de fármaco, poderá apresentar interação medicamentosa ao ser co-administrado com fármacos metabolizados pela subfamília CYP3A, aumentando a sua biodisponibilidade e podendo levar a efeitos tóxicos (FAN; LANNOY, 2014).

Considerações Finais

O lisado preparado a partir dos fígados de ratos Wistar contém quantidade de proteínas totais superior a outros protocolos de extração descritos pela literatura, dessa forma, espera-se que apresente quantidade suficiente de enzimas CYP450 que torne possível testes de atividade enzimática cuja finalidade é avaliar se determinados protótipos de fármacos a serem testados apresentam capacidade de inibição enzimática, o que poderia indicar que apresentariam interação medicamentosa com outros fármacos.

Agradecimentos

Agradecemos ao NEPET – Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.

Referências

DE LUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M. **Farmacologia Integrada**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**. v. 87, p. 93-120, 2014.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. “Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers.” 2011.

LI, W.; XIN, H.; SU, M.; XIONG, L. Inhibitory effects of Schisandrin A and Schisandrin B on CYP3A activity. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**. v. 32, n. 3, p. 1-7, 2010.

MIKASA S, KAWABE K, ONOUE S, WERBA JP, GIROLI M, WATANABE H; YAMADA S. Green Tea Extract Affects the Cytochrome P450 3A Activity and Pharmacokinetics of Simvastatin in Rats. **Drug Metabolism Pharmacokinetics**. v. 28, n. 6, p. 514-518, 2013.

OGA, S.; BASILE, A. C.; CARVALHO, M. S. Guia Zanini-Oga de interações medicamentosas: base teórica das interações. São Paulo: Atheneu, 2002.

OLIVEIRA, S. R.; OLIVEIRA NETO, JR.; SILVA, M. A. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, D. F. A.; CARDOSO, E. C.; CUNHA, L. C. Evaluation of inhibitory effects of some brazilian cerrado plant extracts on CYP3A *in vitro* activity. **International Journal of Pharmacology**. v. 6, n. 1, p. 47–56, 2015.

OLSON, J. **Farmacologia clínica fácil**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

PEKTHONG, D.; BLANCHARD, N.; ABADIE, C.; BONET, A.; HEYD, B.; MANTION, G.; BERTHELOT, A.; RICHERT, L.; MARTIN, H. Effects of *Andrographis paniculata* extract and Andrographolide on hepatic cytochrome P450 mRNA expression and monooxygenase activities after in vivo administration to rats and in vitro in rat and human hepatocyte cultures. **Chemico-Biological Interactions**. v. 179, n. 2-3, p. 247-255, 2009.

QIAO, X.; JI, S.; YU, S. W.; LIN, X. H.; JIN, W. H.; DUAN, Y. K.; ZHANG, L. R.; GUO, D. A.; YE, M. Identification of Key Licorice Constituents Which Interact with Cytochrome P450: Evaluation by LC/MS/MS Cocktail Assay and Metabolic Profiling. **The AAPS Journal**. v. 16, n. 1, p. 101-113, 2014.

TAKAHASHI, K.; UEJIMA, E.; MORISAKI, T.; TAKAHASHI, K.; KUROKAWA, N.; AZUMA, J. In vitro inhibitory effects of Kampo medicines on metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 28, p. 319-327, 2003.

USIA, T.; WATABE, T.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y. Metabolite-cytochrome P450 complex formation by methylenedioxyphenyl lignans of Piper cubeba: Mechanism-based inhibition. **Life Sciences**. v. 76, p. 2381-2391, 2005.