

Avaliação da capacidade de metabolização *in vitro* de enzimas microssomais CYP3A extraídas de fígado de ratos Wistar

João Paulo Morais Dias¹(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.

* joao.paulompereira@outlook.com

Este trabalho deverá testar a viabilidade de enzimas microssomais extraídas de fígados de ratos Wistar quantificando a sua capacidade de metabolização em presença do substrato midazolam (fármaco modelo para a subfamília CYP3A) e do inibidor cetoconazol. Com a determinação da viabilidade das enzimas extraídas será possível avaliar a influência de qualquer substância na atividade desta subfamília, visto que, em farmacocinética, é sabido que qualquer substância em potencial pode ter influência sobre o metabolismo de fármacos ao inibir as enzimas responsáveis pelo metabolismo destes. O objetivo deste trabalho é testar a viabilidade de enzimas microssomais da subfamília CYP3A extraídas de fígados de ratos Wistar. Primeiramente foram reunidos midazolam, NADPH e lisado hepático para ser observada a metabolização do midazolam. Em seguida, foram adicionados midazolam, NADPH, lisado hepático e cetoconazol para ser observada a inibição da metabolização do midazolam. A área do pico de midazolam no primeiro teste demonstrou ser menor que no segundo, o que comprova que realmente as enzimas CYP3A estão ativas no lisado e podem ser inibidas por substâncias que apresentem essa capacidade. Este protocolo demonstrou sua viabilidade e poderá ser usado para avaliar a capacidade de inibição de novos protótipos de fármacos.

Palavras-chave: Citocromo P450. Inibição enzimática. Midazolam. Cetoconazol.

Introdução

A transformação de substratos em produtos mais hidrofílicos e menos tóxicos possibilitando sua eliminação do organismo é chamado de metabolismo ou biotransformação (WILKINSON, 2005, FAN; LANNOY, 2014). 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 microssomais (CYP450) e os fármacos são transformados em moléculas mais polares e mais reativas.

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 deverá testar a viabilidade de enzimas microssomais extraídas de fígados de ratos Wistar quantificando a sua capacidade de metabolização em presença do substrato midazolam (fármaco modelo para a subfamília CYP3A) e do inibidor cetoconazol.

Com a determinação da viabilidade das enzimas extraídas será possível avaliar a influência de qualquer substância na atividade desta subfamília, visto que, em farmacocinética, é sabido que qualquer substância em potencial pode ter influência sobre o metabolismo de fármacos ao inibir as enzimas responsáveis pelo metabolismo destes.

O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade de enzimas microssomais da subfamília CYP3A extraídas de fígados 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: Lisado hepático previamente produzido e armazenado em nitrogênio líquido (COSTA; RODRIGUES, 2017), tampão fosfato de potássio pH 7,4 contendo 36 μM de midazolam e 480 μM de NADPH, cetoconazol 20 $\mu\text{g/mL}$, tampão fosfato de potássio pH 7,4, diazepam, midazolam, centrífuga. Procedimento: Inicialmente foram incubados por 5 minutos: 200 μL de tampão fosfato de potássio pH 7,4 contendo 36 μM de midazolam e 480 μM de NADPH. Um volume de 180 μL de tampão fosfato de potássio pH 7,4 foram adicionados e a mistura homogeneizada

por 10 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 400 μL de lisado hepático. Após 60 minutos a reação foi interrompida com a adição de 200 μL de metanol gelado e o padrão interno, diazepam 5 $\mu\text{g/mL}$, foi adicionado. A mistura foi centrifugada a 13.000 g por 10 min. O sobrenadante foi injetado em cromatógrafo líquido e a área do pico de midazolam foi determinada por método de Moreira e Rodrigues (2017) baseado em método de Li e colaboradores (2010).

Em seguida, foram incubados por 5 minutos: 200 μL de tampão fosfato de potássio pH 7,4 contendo 36 μM de midazolam e 480 μM de NADPH. Um volume de 180 μL de solução de inibição (cetoconazol 20 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado e a mistura homogeneizada por 10 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 400 μL de lisado hepático. Após 60 minutos a reação foi interrompida com a adição de 200 μL de metanol gelado e o padrão interno, diazepam 5 $\mu\text{g/mL}$, foi adicionado. A mistura foi centrifugada a 13.000 g por 10 min. O sobrenadante foi injetado em cromatógrafo líquido e a área do pico de midazolam foi determinada por método de Moreira e Rodrigues (2017) baseado em método de Li e colaboradores (2010). As áreas dos picos de midazolam antes e depois da adição de cetoconazol foram comparadas.

Resultados e Discussão

O lisado produzido a partir de fígados de ratos Wistar demonstrou conter enzimas microssomais da subfamília CYP3A ativas, já que houve metabolização do midazolam - seu substrato modelo (FDA, 2011) conforme Tabela 1.

Tabela 1. Áreas médias dos picos de midazolam na presença e na ausência de cetoconazol (controle positivo de inibição).

	Área média do pico de midazolam	Porcentagem de inibição considerada
Lisado + NADPH + midazolam	31461,50	0%
Lisado + NADPH + midazolam + cetoconazol	51140,50	100%

A utilização de cetoconazol no meio reacional causou a inibição das enzimas CYP3A e portanto, a não metabolização do midazolam, como pode ser observado na Tabela 1.

Utilizado como controle positivo nos testes de inibição, o cetoconazol é descrito na literatura como inibidor seletivo das enzimas CYP3A (FDA, 2011). A área do pico do midazolam obtida por este teste foi considerada como 100 % de inibição das enzimas microssomais CYP3A enquanto a área do pico de midazolam do teste anterior (teste de metabolização) foi considerada 0 % de inibição. Foi observado que a área do pico de midazolam foi menor no teste de metabolização (sem o cetoconazol).

Estes resultados demonstram que este protocolo é viável e útil para os testes de inibição enzimática de protótipos de novos fármacos. Pode-se agora adicionar a este meio alguma outra droga (no lugar do cetoconazol) 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

Apresentou-se um protocolo que torna possível 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

COSTA, H. R. F.; RODRIGUES, C. R. Produção de lisado hepático de ratos Wistar para análise de capacidade de metabolização de CYP3A. In: **Anais do IV CEPE – Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**. Pirenópolis: 2017 (No prelo).

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.

MOREIRA, J. M.; RODRIGUES, C. R. Validação do método de quantificação de midazolam em matriz biológica para determinação de capacidade inibitória do protótipo LQFM018 sob enzimas CYP3A. In: **Anais do IV CEPE – Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**. Pirenópolis: 2017 (No prelo).

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.

WILKINSON, G. R. IN: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10 ed., McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2005, 1647p.