

Avaliação da capacidade de inibição de enzimas CYP3A pelo protótipo de fármaco antitumoral LQFM018

Marília Aparecida Silva¹(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.

* mariliaa.silva@hotmail.com

O composto LQFM018 foi sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM-UFG) e após triagem, demonstrou atividade antineoplásica contra linhagem leucêmica. Dessa forma, foi selecionado para passar por testes pré-clínicos farmacocinéticos e avaliação de possível interação medicamentosa com medicamentos. Como a subfamília de enzimas hepáticas CYP3A é responsável pela biotransformação de pelo menos 50 % dos fármacos conhecidos, esta foi selecionada para os testes de inibição enzimática com o protótipo em questão. O LQFM018 foi testado em 3 concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) na presença de lisado hepático extraído de fígados de ratos Wistar, NADPH e midazolam (substrato). Verificou-se que na menor concentração testada, o protótipo não inibiu as enzimas do lisado. Na concentração média houve inibição de $56,52 \pm 0,07$ % e na concentração alta houve inibição total das enzimas. Assim, pode-se observar que a inibição de CYP3A pelo LQFM018 tem característica dose-dependente *in vitro* e que este protótipo poderá aumentar a biodisponibilidade de fármacos metabolizados pela subfamília CYP3A.

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

Introdução

Em 2004, Vassilev e colaboradores identificaram, por meio de análises em bibliotecas de produtos químicos sintéticos, um grupo de moléculas que possuíam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, denominando-as nutlins. No ano de 2011, foi desenvolvida uma linha de pesquisa no Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) com o intuito de obter compostos com o mesmo mecanismo de ação dos nutlins na qual, através da simplificação molecular, conseguiu-se elaborar o desenho, a síntese e a avaliação do perfil antineoplásico de novos candidatos a protótipos de fármaco, obtidos a partir do protótipo nutlin-3 (CARVALHO, 2011).

O composto LQFM018 foi sintetizado sob a orientação do Prof. Ricardo Menegatti (UFG) e após triagem, demonstrou atividade antitumoral sendo considerados promissores agentes citotóxicos (CARVALHO, 2011). Esta molécula foi

então encaminhada ao laboratório NEPET-UFG para os testes farmacocinéticos pré-clínicos.

A farmacocinética do protótipo LQFM018 foi preliminarmente testada por Rodrigues (2015) utilizando LC-MS/MS que conduziu a administração deste composto em ratos na dose de 100 mg/kg i.p. Foram obtidos parâmetros farmacocinéticos favoráveis à sua utilização em tecidos profundos, como alto valor de volume de distribuição. Porém, mais informações seriam necessárias para a melhor avaliação do protótipo, sendo estas o valor de biodisponibilidade do composto por via oral e o tipo de cinética em concentrações farmacológicas efetivas (linear ou ordem zero).

Rodrigues (2016) por sua vez conduziu estes testes farmacocinéticos em camundongos, utilizando LC-MS/MS, e encontrou valores de volume de distribuição e clearance altos, tempo de meia-vida médio, farmacocinética linear nas doses testadas com sutil sugestão de acúmulo nos sistemas enzimáticos de eliminação. Adicionalmente, o composto LQFM018 demonstrou baixa biodisponibilidade por via oral, o que sugere eliminação pré-sistêmica hepática.

Considerando estes resultados iniciais, que revelaram a ação farmacológica do protótipo LQFM018 para perfil de atividade antineoplásica aliados aos estudos cinéticos em ratos e camundongos em realização pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico Farmacológicas (NEPET) da UFG, entende-se que é necessário continuar estes estudos no sentido de analisar também a possível interferência do LQFM018 no metabolismo de outras drogas.

A procura de novos fármacos com ação antitumoral e propriedades menos agressivas é de suma importância. O desenvolvimento desses fármacos se justifica pela necessidade de drogas mais seletivas para a quimioterapia antineoplásica, visto que, além dos efeitos adversos causados pelos tratamentos atuais, alguns tipos de câncer ainda não possuem terapia farmacológica adequada (RODRIGUES, 2016).

O objetivo deste trabalho foi testar a capacidade inibitória do protótipo de fármaco antitumoral LQFM018 sob enzimas CYP3A extraídas de fígado de ratos Wistar.

Material e Métodos

O protótipo LQFM18 foi gentilmente fornecido pelo professor Dr. Ricardo Menegatti - Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás - LQFM. Lisado hepático previamente produzido e armazenado em nitrogênio líquido, de 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.

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 solução de inibição (LQFM018 nas concentrações de 100, 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO 5 %) ou tampão fosfato de potássio pH 7,4 foram adicionados e homogeneizados por 10 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 400 μL de lisado hepático, produzido por Costa e Rodrigues (2017). Após 60 minutos a reação foi interrompida com a adição de 200 μL de metanol gelado e o padrão interno (diazepam 5 $\mu\text{g/mL}$). A mistura foi centrifugada a 13.000 g por 10 min. O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo líquido (LI et al., 2010, adaptado).

Para calcular a porcentagem de inibição das enzimas, o midazolam foi quantificado (MOREIRA; RODRIGUES, 2017) na presença e na ausência da substância teste (LQFM018) e essa diferença representou sua capacidade de inibição. Esses resultados foram comparados aos obtidos por Dias e Rodrigues (2017) para a determinação da porcentagem de inibição.

Resultados e Discussão

A menor concentração de LQFM018 (10 $\mu\text{g/mL}$) não interferiu com o metabolismo do midazolam. A concentração média de LQFM018 (50 $\mu\text{g/mL}$) inibiu aproximadamente metade da capacidade de metabolização das enzimas. Porém, na maior concentração testada (100 $\mu\text{g/mL}$), o composto LQFM018 inibiu totalmente a atividade das enzimas CYP3A. Nesta concentração, não foi possível observar a diminuição da área de pico do midazolam nem a formação de produtos de degradação de midazolam gerando um comportamento semelhante ao controle positivo testado com cetoconazol (DIAS; RODRIGUES, 2017).

Tabela 1. Percentual de inibição de enzimas CYP3A extraídas de fígado de ratos Wistar por LQFM018 *in vitro* em diferentes concentrações.

LQFM018 (µg/mL)	Inibição (%)
100	total
50	56,52 ± 0,07
10	0

Portanto, existe uma suposição de que o LQFM018 poderia interferir no metabolismo de outras moléculas aumentando sua biodisponibilidade (especialmente aquelas que são metabolizados pela subfamília CYP3A, como ciclosporina, carbamazepina, eritromicina, tamoxifeno e benzodiazepinas) (TOZER; ROWLAND, 2009). No presente estudo, uma inibição dependente da dose foi relatada com base no efeito de LQFM018 no metabolismo do midazolam por enzimas hepáticas.

Considerações Finais

O protótipo LQFM018 inibe enzimas da subfamília CYP3A em concentrações maiores que 50 µg/mL *in vitro*. Este resultado indica que ele poderá causar futuras interações medicamentosas.

Agradecimentos

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

Referências

CARVALHO, F. S. Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais. Goiânia, 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, 95p.

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).

DIAS, J. P. M.; RODRIGUES, C. R. Avaliação da capacidade de metabolização *in vitro* de enzimas microsossomais CYP3A extraídas de fígado de ratos Wistar. In: **Anais do IV CEPE – Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**. Pirenópolis: 2017 (No prelo).

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, 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).

RODRIGUES, A. R. Estudo do perfil cinético do protótipo de fármaco antineoplásico LQFM018 em modelos experimentais por LC-MS/MS. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

RODRIGUES, C. R. Estudo farmacocinético do protótipo de fármaco antineoplásico LQFM018 em modelos pré-clínicos. Tese (Pós-graduação em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica. As bases quantitativas da terapia farmacológica**. 1ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARNAVAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**. v. 303, n. 5659, p. 844-848, 2004.