

Determinação dos parâmetros farmacocinéticos de protótipo de fármaco antineoplásico derivado dos nutlins em modelos experimentais por LC-MS/MS

Caroline Rego Rodrigues¹(PQ)*, Luiz Carlos da Cunha²(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.

2 Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia. NEPET, Av. Universitária nº 1166 - Setor Universitário -Goiânia – Goiás – Brasil. CEP: 74605-010.

* caroline.rodrigues@ueg.br

O composto LQFM018 é um protótipo de fármaco antitumoral desenvolvido pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás. O objetivo deste trabalho foi avaliar a farmacocinética deste composto por via intraperitoneal em camundongos nas doses de 100, 50 e 25 mg/kg de peso corporal. As coletas de sangue dos animais foram feitas ao longo de 24 h por punção cardíaca e o sangue foi centrifugado para separação do plasma (congelado a - 20 °C até o momento das análises). A quantificação do LQFM018 foi feita por HPLC-MS/MS e os resultados foram plotados em curvas concentração *versus* tempo. A partir da curva foram determinados os parâmetros de área sob a curva, meia-vida, volume de distribuição e *clearance*. A cinética foi avaliada quanto à possibilidade de saturação. Os resultados demonstraram que o composto estudado é rapidamente absorvido, se distribui largamente no organismo e é rapidamente eliminado. Tais características corroboram sua estrutura altamente lipofílica. Picos múltiplos de C_{max} indicam que pode haver recirculação êntero-hepática. A cinética demonstrou ser linear na faixa de concentração testada. O composto apresenta características que podem favorecer sua indicação para o tratamento de tumores profundos.

Palavras-chave: LQFM018. Meia-vida. Área sob a curva. Volume de distribuição. *Clearance*. Cinética linear.

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).

A farmacocinética do protótipo LQFM018 foi preliminarmente testada no NEPET utilizando LC-MS/MS com 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 testes seriam necessários para avaliar a cinética deste composto (linear ou ordem zero).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um teste farmacocinético em camundongos, utilizando LC-MS/MS, para encontrar valores de volume de distribuição e *clearance*, tempo de meia-vida, tipo de farmacocinética (linear ou ordem zero) nas doses de 100, 50 e 25 mg/kg por via intraperitoneal.

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG) sob o nº 042/2013. O protótipo LQFM18 foi gentilmente fornecido pelo professor Dr. Ricardo Menegatti - Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás – LQFM. Metodologia bioanalítica: sistema cromatográfico composto por HPLC Agilent 1200 Series acoplado a um espectrômetro de massas API 3200 MS/MS, do ICF. Fase móvel constituída de tampão acetato de amônio:metanol (20:80). Fluxo: 1200 µL/min. Diluente: metanol 50%. Volume de injeção: 1 µL. Coluna cromatográfica: ACE 5 C18 50 x 4.6 mm. Temperatura coluna: 30 °C (GOMES, 2014).

Os animais (camundongos Swiss) receberam doses baixa, média e alta (25, 50 e 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente) do protótipo LQFM18, por via intraperitoneal. O volume de solução administrada foi de 100 µL. A substância teste foi administrada em solução preparada em etanol, propilenoglicol e água ultrapura nas proporções de 10:50:40 (v/v/v), com prévia suspensão alimentar 2 h antes do início do experimento. Todos os animais foram anestesiados com solução de cetamina (87,5%) e xilazina (12,5%). Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo.

As amostras foram coletadas por punção cardíaca (500 µL) nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 9; 12; 18 e 24 h, centrifugadas a 3000 rpm por 12 min para separação do plasma, visando à sua quantificação. Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até o início das análises. A extração líquido-líquido foi

conduzida com metil-terc-butil-éter (MTBE) utilizando diazepam (20 µg/mL) como padrão interno (PI).

Resultados e Discussão

Após administração intraperitoneal do LQFM018 nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg em camundongos (triplicata), a curva de concentração *versus* tempo foi obtida e está demonstrada na Figura 1. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

Figura 1. Curva concentração *versus* tempo da molécula LQFM018 administrada em camundongos por via intraperitoneal nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso corporal. As barras verticais representam SD, desvio padrão (GraphPad PRISM®, version 5.01).

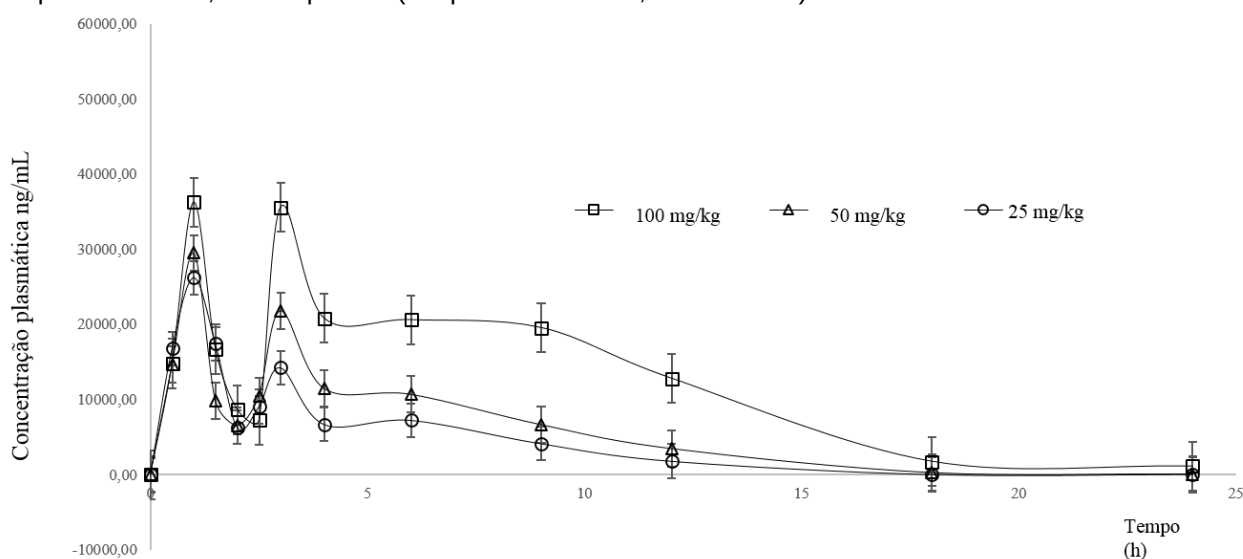


Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos da molécula LQFM018 administrada em camundongos por via intraperitoneal nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso corporal (Pharsight software WinNonlin 5.0).

Parâmetros	Unidade	Doses (mg/kg, média ± SD)		
		100	50	25
C _{max}	ng/mL	40190.73 ± 5079.44	29490.83 ± 2955.01	26202.27 ± 2571.11
T _{max}	h	1.33 ± 1.15	1.03 ± 0.06	1.02 ± 0.03
AUC _T	ng/mL x h	289139.60 ± 34625.55	133376.90 ± 14320.20	98292.46 ± 12245.49
MRT _T	h	7.29 ± 0.28	5.42 ± 0.14	4.55 ± 0.70
Cl _T	mL/min/kg	15.31 ± 0.74 ^{a, c}	17.97 ± 0.64 ^{a, b}	8.39 ± 0.52 ^{b, c}
t _{1/2}	h	4.43 ± 0.21 ^{a, c}	4.20 ± 0.13 ^{a, b}	4.53 ± 0.51 ^{b, c}
V _d	L/kg	6.13 ± 0.30 ^{a, c}	6.63 ± 0.26 ^{a, b}	3.35 ± 0.21 ^{b, c}

C_{max} = concentração máxima; t_{max} = tempo para atingir a concentração máxima; AUC_T ou AUC_{0-∞} = área sob a curva de concentração *versus* tempo (do inglês area under curve); MRT_T = tempo médio de residência; Cl_T = clearance total; t_{1/2} = meia-vida; V_d = volume de distribuição.

a p > 0.05 Teste t de Student relacionando doses de 100 com 50 mg/kg.

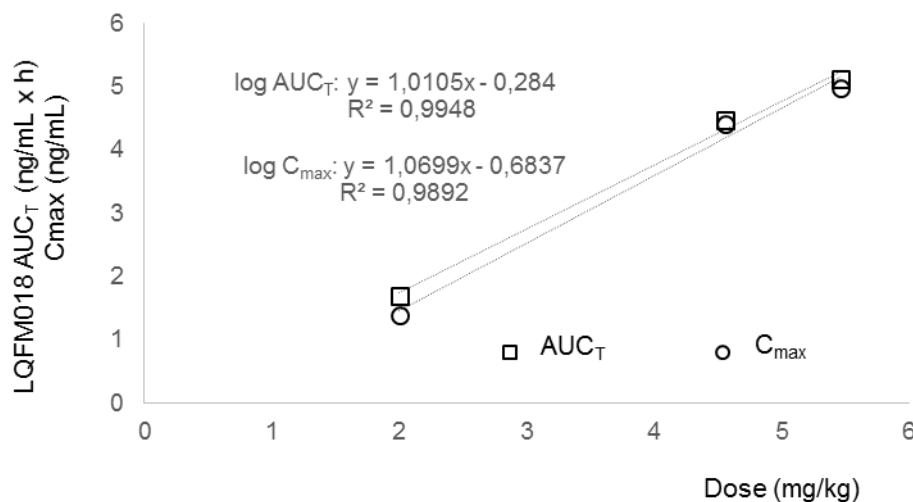
b p > 0.05 Teste t de Student relacionando doses de 50 com 25 mg/kg.

c p > 0.05 Teste t de Student relacionando doses de 100 com 25 mg/kg.

Após administração intraperitoneal do LQFM018, a absorção da droga pelo trato gastrointestinal foi rápida. A molécula foi detectada no plasma após a primeira administração (30 min) e rapidamente chegou à concentração máxima ($t_{\max} = 1$ h) para todas as concentrações estudadas. Adicionalmente, múltiplos picos de $C_{\max}$ foram observados na Figura 1 para as três doses administradas (indicando recirculação êntero-hepática) (TOZER; ROWLAND, 2006).

A Figura 2 mostra a relação linear entre o aumento da dose da droga administrada e o aumento do $C_{\max}$ e da AUC_T . O coeficiente de correlação linear entre o log de AUC_T e o log da dose foi próximo de 1,0 (0,9995).

Figura 2. Relação entre o log de $C_{\max}$ e o log de AUC_T versus dose de LQFM018 em camundongos recebendo 100, 50 e 25 mg/kg de peso corporal.



Além disso, outros parâmetros farmacocinéticos do LQFM018 listados na Tabela 1 não foram significativamente diferentes entre as três doses estudadas ($p > 0.05$), exceto por $C_{\max}$, indicando que os parâmetros farmacocinéticos encontrados independem da dose administrada. Dessa forma, pode-se afirmar que a cinética do LQFM018 é linear na faixa de concentração estudada. Os valores de meia-vida e MRT demonstraram que a droga foi rapidamente absorvida e eliminada. A Figura 3 mostra que após 20 h da administração não havia mais quantidade significativa da droga no plasma.

O volume de distribuição encontrado é considerado alto e demonstra que o LQFM018 foi largamente distribuído o que pode levar ao acúmulo extravascular deste composto. Esses resultados são consistentes com a natureza lipofílica do composto e seu alto valor de *clearance* (valores mais altos que os encontrados por Zhang et al. (2011) para o nutlin-3a). Comparando esse valor ao *clearance* da

creatinina, é possível afirmar que o provável mecanismo de eliminação do composto LQFM018 envolve secreção tubular ativa somando-se a isso outros mecanismos de eliminação hepáticos. Tais características sugerem uma potencial aplicação deste composto no tratamento de tumores profundos tais como os de medula óssea (como ocorre com a indicação do nutlin-3a) (VASSILEV et al., 2004).

Considerações Finais

A farmacocinética do protótipo LQFM018 demonstrou ser linear no intervalo estudado. Este resultado favorece a utilização do composto *in vivo* pois demonstra que os parâmetros encontrados não mudam com a alteração da posologia. O protótipo LQFM018 possivelmente sofre recirculação êntero-hepática. Este achado é apoiado pela alta lipossolubilidade do composto. Os valores de Cl_r e V_d do protótipo LQFM018 demonstraram ser elevados. Estes resultados sugerem que o composto poderá ser indicado para o tratamento de tumores profundos.

Agradecimentos

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

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.

GOMES, S. A. Desenvolvimento e validação de técnica bioanalítica em LC-MS/MS para detecção e quantificação de protótipos antineoplásicos. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

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.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. v. 303, p. 844–8, 2004.

ZHANG, F.; TAGEN, M.; THROM, S.; MALLARI, J.; MILLER, L.; GUY, R. K.; DYER, M. A.; WILLIAMS, R. T.; ROUSSEL, M. F.; NEMETH, K. et al. Whole-body physiologically based pharmacokinetic model for nutlin-3a in mice after intravenous and oral administration. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. v. 39, n. 1, p. 15-21, 2011.