

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Identificação Estrutural de Metabólitos Provenientes do
Metabolismo *in vitro* de Compostos Bioativos e Estudos de
Fenotipagem Enzimática”**

Josiane de Oliveira Cardoso *

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

*** Bolsista CNPQ**

São Carlos – SP
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C268i Cardoso, Josiane de Oliveira
Identificação estrutural de metabólitos
provenientes do metabolismo in vitro de compostos
bioativos e estudos de fenotipagem enzimática /
Josiane de Oliveira Cardoso. -- São Carlos : UFSCar,
2015.
126 p.

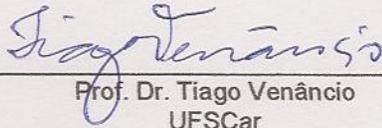
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

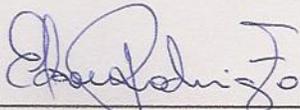
1. Metabolismo in vitro. 2. Identificação
estrutural. 3. LC-MS. 4. RMN. 5. Fenotipagem
enzimática. I. Título.

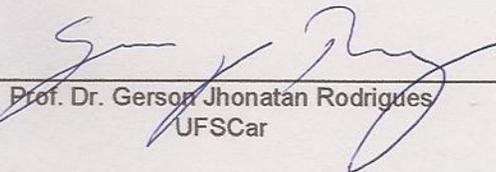


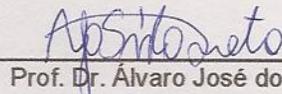
Folha de Aprovação

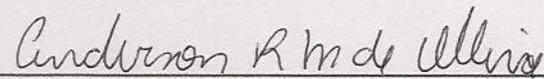
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Josiane de Oliveira Cardoso, realizada em 25/08/2015:


Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar


Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar


Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar


Prof. Dr. Alvaro José dos Santos Neto
IQSC/USP


Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira
FFCLRP/USP

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos... e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência... e não tivesse amor, nada seria.”

I Cor. 13:1-2

“The scientist is not a person who gives the right answers; he is one who asks the rights questions”.

Claude Levi-Strauss

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me guiando aos caminhos mais sensatos e dando-me sabedoria em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe, por todo carinho, paciência e incentivo, e por não medir esforços para que eu atingisse os meus objetivos.

Ao meu irmão Jordicelio, pela cumplicidade, amizade, apoio, carinho, paciência e incentivo.

Ao meu tio Leomar, pelo carinho e por toda dedicação à nossa família.

A minha linda e amada sobrinha, Laura, por me fazer acreditar através da sua inocência que a vida pode ser diferente...

Ao amor da minha vida, Juliano, pelo companheirismo, pela terapia diária, pelos bons momentos, paciência, apoio e carinho...

A todos os meus familiares pelo apoio incondicional. Em especial à minha prima e amiga Sarah pela sua amizade, pelos bons momentos e risadas...

A minha amiga Bianca Ferreira, por todo o incentivo, ensinamentos e momentos de distração...

A Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira, profissional de excelência que terei sempre como exemplo. Agradeço pela orientação, dedicação, confiança, amizade e por ter contribuído de forma tão expressiva na minha formação.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio pelos ensinamentos, orientação, incentivo e amizade.

A Profa. Dra. Quezia Cass pelo apoio, disposição, incentivo, e confiança.

Ao Prof. Dr. Zeruesenay Desta por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação, disponibilidade e incentivo durante a realização do meu doutorado sanduíche.

Aos membros do Departamento de Farmacologia Clínica da Escola de Medicina da Universidade Indiana, Indianápolis – Indiana, Estados Unidos, em especial ao Prof. Dr. David Flockhart pelo suporte e incentivo.

Aos meus amigos Ingrid Ferreira Metzger, Evandro Neto Neves, Silvia B. Campos-Bilderback e seu esposo Michael por todo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba e a Profa. Dra. Rosângela Gonçalves

Peccinini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara pela doação dos fígados de ratos.

Ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por ter fornecido o composto LPSF-PT-31.

A todos os amigos do grupo de pesquisa CLAE/Separare, Bibi, Ju, Marry, Amanda, Kenia, Neila, Alexandre, Ricardo, Bruno, Adriana e Fernando pela amizade, discussões, suporte técnico e psicológico...

A todos os professores e membros do Departamento de Química da UFSCar-São Carlos.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

A CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina Sérica Bovina
CYPs	Enzimas do citocromo P450
CysLT1	Receptores leucotrienos cisteínicos subtipo 1
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
GST	Glutathione S-transferase
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
HLMs	Microssomas do fígado humano
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MS	Espectrometria de massas
NADP	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NAT	N-acetil transferases
NCEs	Novas entidades químicas
OATP	Polipeptídeo transportador de ânion orgânico
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
RLMs	Microssoma de fígado de ratos
RMN	Ressonância magnética nuclear
SRM	Reações de íons selecionados
SULT	Sulfotransferases
UDPGA	Uridina difosfato-ácido glucurônico
UGTs	Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases
M1	Montelucaste acil- β -D-glucuronídeo
M2	Montelucaste sulfóxido

M3	25-hidroxi-montelucaste
M4	Ácido dicarboxílico montelucaste
M5a	21(R)-hidroxi-montelucaste
M5b	21-(S)-hidroxi-montelucaste
M6	Montelucaste 1,2-diol
M7	α -hidroxi-montelucaste

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Lista exemplos de substratos e inibidores específicos das principais isoformas de CYPs envolvidas no metabolismo de fármacos em humanos ³⁹	8
TABELA 1.2- Exemplos de marcadores e inibidores para as principais isoformas de UGTs envolvidas no metabolismo hepático de fase II em humanos ^{24,69,70}	10
TABELA 2.1- Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial 2 ⁴	24
TABELA 2.2 - Matriz de planejamento dos experimentos para planejamento fatorial 2 ⁴	25
TABELA 2.3 - Exatidão (%) e precisão (%) obtidas para as diferentes concentrações da curva de calibração para BSA (n=3).....	29
TABELA 2.4 - Resultados relevantes do planejamento experimental	32
TABELA 2.5 - Principais efeitos e interações entre as variáveis	34
TABELA 2.6- Deslocamento químico e multiplicidade do LPSF-PT-31 e M1	46
TABELA 3.1 - Transições monitoradas para análise do montelucaste e seus metabólitos e os parâmetros do MS específicos para cada analito.....	59
TABELA 3.2 – Condições de incubação avaliadas durante a otimização das condições de metabolismo <i>in vitro</i> do montelucaste	60
TABELA 3.3 - Parâmetros cinéticos para a formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo oxidativo do montelucaste em dois HLMS	80
TABELA 3.4 - Correlação da velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo do montelucaste (1,0 µmol/L) com as atividades de diferentes isoformas de P450s e conteúdo total de P450s em 14 HLMS	84
TABELA 3.5 – Parâmetros cinéticos para a formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo do montelucaste utilizando as isoformas expressas CYP2C8, CYP2C9 e CYP3A4.....	90
TABELA 3.6 – Inibição química do metabolismo do montelucaste por inibidores seletivos das isoformas de CYPs em HLMS	93
TABELA 3.7- Parâmetros cinéticos para a formação do montelucaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo a partir da glucuronidação do montelucaste utilizando duas preparações de HLMS e a isoforma expressa UGT1A3	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Estrutura simplificada do sítio catalítico das enzimas do citocromo P450 (Adaptado SONO et al., 1996). ³⁸	5
FIGURA 1.2 – Esquema representativo dos aspectos gerais do ciclo catalítico das enzimas do citocromo P450 (adaptado de ISIN e GUENGERICH, 2007). ⁴¹ RH: substrato e ROH: metabólito formado.	6
FIGURA 1.3 - Representação esquemática das diferentes contribuições das isoformas de CYPs no metabolismo de 248 fármacos clinicamente utilizados com metabolismo majoritariamente via CYP P450s (adaptado de ZANGER et al., 2013). ⁴⁶	7
FIGURA 1.4 – Representação esquemática da reação enzimática catalisada por UGTs (adaptado de GUILLEMETTE et al., 2014). ²⁴	8
FIGURA 2.1- Estrutura química da clonidina, dexmedetomidina e LPSF-PT-31.....	17
FIGURA 2.2 - Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA para a determinação da concentração proteica da fração microsomal de fígados de rato.	29
FIGURA 2.3 – Análises por LC-MS. (a) Cromatograma de íon extraído (EIC) relativo ao LPSF-PT31 (<i>m/z</i> 243) em fração microsomal na concentração de 16 $\mu\text{mol/L}$. (b) Espectro de massas referente à banda cromatográfica do LPSF-PT31, onde a molécula protonada apresenta <i>m/z</i> 243. Coluna Phenomenex Luna fenil-hexil (5 μm ; 150 x 2,0 mm); fase móvel: metanol/tampão acetato de amônio (5 mM; pH 5,5) (60:40,v/v); vazão: 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 μL	31
FIGURA 2.4 - Cromatograma de íon extraído (EIC) do <i>m/z</i> 243, relativo aos experimentos de planejamento experimental LPSF-PT31. (a) Controle (ausência de NADPH) e experimento 1; (b) Controle (ausência de NADPH), experimento 12 e experimento 16.....	33
FIGURA 2.5 - (a) Cromatograma de íons totais sobrepostos da amostra controle na ausência de NADPH (preto), amostra controle na ausência de LPSF-PT-31 (rosa) e amostra de biotransformação do LPSF-PT-31 (azul). (b) Espectro de massa do M1. LPSF-PT-31 (20 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com RLMs (10 mg/mL) e sistema gerador de NADPH (volume total de 500 μL) a 37 °C por 60 min. Aquisição dos dados: <i>full MS scan</i> (100 - 400 <i>m/z</i>); tempo de acúmulo de íons no <i>trap</i> de 100 ms.....	36
FIGURA 2.6 – Cromatograma de íon extraído do <i>m/z</i> 259 do LPSF-PT-31 em amostras controles e de biotransformação a partir da incubação do LPSF-PT-31 (100 $\mu\text{mol/L}$) com sistema gerador de NADPH (volume final de 500 μL) a 37 °C por 60 min. (a) em HLMs (1,0 mg/mL) (b) em RLMs (1,0 mg/mL). Aquisição dos dados: <i>full MS scan</i> (100 - 400 <i>m/z</i>); tempo de acúmulo de íons no <i>trap</i> de 100 ms. As amostras controles incluem: amostras em ausência de substrato, ausência de sistema gerador de NADPH, ausência de microsossoma e tempo zero min de	

incubação; as quais apresentam uma baixa relação sinal-ruído em relação à intensidade do sinal do metabólito.	38
FIGURA 2.7 - Espectro de massa referente à banda cromatográfica do metabólito LPSF-PT-31 proveniente da biotransformação utilizando HLMs. LPSF-PT-31 (100 µmol/L) foi incubado com HLMs (1,0 mg/mL) e sistema gerador de NADPH (volume total de 500 µL) a 37 °C por 60 min. Aquisição dos dados: full MS scan (70 - 350 m/z); tempo de acúmulo de íons no trap de 100 ms.....	39
FIGURA 2.8 - Espectro de íons fragmentos do metabólito do LPSF-PT-31 proveniente do metabolismo em RLMs (a) MS ² m/z 259, (b) MS ³ m/z 241. Aquisição dos dados: <i>cut off</i> 65, amplitude de fragmentação de 0,28 V para MS ² (m/z 259) e 0,22 V para MS ³ (m/z 241).	40
FIGURA 2.9 - Espectro de íons fragmentos do metabólito do LPSF-PT-31 proveniente do metabolismo em HLMs (a) MS ² m/z 259, (b) MS ³ m/z 241. Aquisição dos dados: <i>cut off</i> 65, amplitude de fragmentação de 0,43 V para MS ² (m/z 259) e 0,35 V para MS ³ (m/z 241).	41
FIGURA 2.10 – (a) Espectro de íons produtos (MS ²) da molécula protonada do PSF-PT-31 (m/z 243) e (b) sua proposta de fragmentação. Aquisição dos dados: <i>cut off</i> 65 e amplitude de fragmentação de 0,30 V.	43
FIGURA 2.11 - Espectro de ¹ H-RMN (a) LPSF-PT-31, (b) metabólito do LPSF-PT-31. Ambas amostras foram dissolvidas em CD ₃ CN. Condições RMN (Bruker Avance III-600): sonda criogênica de 5mm TCI ¹ H { ¹³ C, ¹⁵ N}. Sequência de pulsos ¹ H RMN: 1D version NOESY sequence; supressão de água e acetonitrila: d1=2,40 s; 64.000 pontos em uma janela espectral de 12.019,23 Hz; tempo aquisição= 2,73 s; ns=256 scans.	45
FIGURA 2.12 - Proposta de fragmentação para o metabólito do LPSF-PT-31 considerando a hidroxilação no anel imidazolidina.....	47
FIGURA 2.13 - Reação metabólica proposta para LPSF-PT-31 a partir do metabolismo <i>in vitro</i> em microsomas de fígado humano e de rato.....	48
FIGURA 3.1 - Estrutura química do montelucaste.....	51
FIGURA 3.2 - Estrutura química dos metabólitos do montelucaste. M1: montelucaste acil-β-D-glucuronídeo; M2: montelucaste sulfóxido; M3: 25-hidroxi-montelucaste; M4: ácido dicarboxílico montelucaste; M5a: 21(R)-hidroxi-montelucaste; M5b: 21-(S)-hidroxi-montelucaste; M6: montelucaste 1,2-diol e M7: α- hidroxi-montelucaste.	53
FIGURA 3.3 – Percentual de decaimento da concentração do montelucaste obtidos através das reações mediadas por CYPs, UGTs e pela combinação de ambas vias (CYPs + UGTs). (a) Condição I: para P450s: Solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4); para UGTs e combinado (P450 + UGT): Solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (3,4 mmol/L), EDTA (1,15 mmol/L) e sacarolactona (115 µmol/L) (adaptado de KILFORD et al., 2009 ¹⁷³); (b) Condição II: Solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L) (adaptado	

de WALSKY et al., 2012⁶³); (c) Condição III: Solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl₂ (3,3 mmol/L); (d) Condição IV: Solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl₂ (1,0 mmol/L) e sacarolactona (5,0 mmol/L) (adaptado de FISHER et al., 2000⁶¹). Montelukaste (0,05 µmol/L) foi incubado com HLMs (0,25 mg/mL) nas respectivas condições por 90 min a 37 °C. . 72

FIGURA 3.4 – Efeitos da concentração de alameticina no percentual de decaimento da concentração do montelukaste. (a) via glucuronidação. Montelukaste (0,05 µmol/L) foi incubado na presença de HLMs ativado (0,025 mg/mL) com alameticina (0 - 50 µg/mg proteína), solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl₂ (5,0 mmol/L) e do cofator UDPGA (5,0 mmol/L) (volume total de 250 µL) por 90 min a 37 °C. (b) via CYP P450. Montelukaste (0,05 µmol/L) foi incubado na presença de HLMs ativado (0,025 mg/mL) com alameticina (0 e 50 µg/mg proteína), da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e do sistema gerador de NADPH (volume total de 250 µL) por 90 min a 37 °C. 75

FIGURA 3.5 – Cromatograma representativo do perfil de separação obtido por LC-MS/MS no modo SRM para montelukaste e seus hidroximetabólitos provenientes da incubação de montelukaste (1,0 µmol/L) em solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4), HLMs (0,25 mg/mL) e sistema regenerador de NADPH por 30 min à 37 °C. Coluna Luna C18 (100 x 2,0 mm; 3 µm); fase móvel: acetonitrila/água acidificada (0,1% de ácido fórmico) 85:15 (v/v); vazão de 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 µL. As transições monitoradas estão descritas na Tabela 3.1. 78

FIGURA 3.6 – Gráficos representativos da linearidade de formação dos hidroximetabólitos do montelukaste. (a) Curva de tempo de incubação x formação de metabólito. Montelukaste (1,0 µmol/L) foi incubado em solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4), HLMs (0,25 mg/mL) e sistema regenerador de NADPH à 37 °C. A reação foi terminada em 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 min de incubação. (b) Curva de concentração proteica x formação de metabólito. Montelukaste (1,0 µmol/L) foi incubado em solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4), HLMs (0,0 – 1,0 mg/mL) e sistema regenerador de NADPH por 30 min à 37 °C..... 79

FIGURA 3.7 – Perfil cinético representativo do metabolismo do montelukaste em dois HLMs. Concentrações crescentes de montelukaste (0-15 µmol/L) foram incubadas com HLMs (0,25 mg/mL) e sistema gerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações..... 80

FIGURA 3.8 – Gráficos de Eadie-Hofstee para o metabolismo oxidativo do montelukaste em dois HLMs. 82

FIGURA 3.9 – Velocidade de formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste em um painel de 14 HLMs caracterizados. Montelukaste (1,0 µmol/L) foi incubado com HLMs (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema gerador de NADPH por 30 min a 37 °C..... 83

FIGURA 3.10 - Velocidade de formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste em um painel de 10

isoformas expressas de CYPs. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com cada isoforma de CYP (20 pmol) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 37 °C..... 86

FIGURA 3.11 - Velocidade de formação do montelukaste sulfóxido em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com cada isoforma de CYP (20 pmol) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 37 °C..... 87

FIGURA 3.12 - Velocidade de formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs. Montelukaste (0,02 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com cada isoforma de CYP (20 pmol) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Os metabólitos 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste ficaram abaixo do limite de quantificação nesta concentração de montelukaste avaliada..... 88

FIGURA 3.13 - Perfil cinético representativo da formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste a partir do metabolismo do montelukaste utilizando as isoformas expressas CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11. Concentrações crescentes de montelukaste (0-15 $\mu\text{mol/L}$) foram incubadas com cada isoforma (20 pmol) e sistema gerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações... 89

FIGURA 3.14 - Inibição química da formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste por inibidores seletivos das isoformas de CYPs em HLMS. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado na presença de inibidores químicos, HLMS (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Os dados de inibição estão apresentados como a média \pm S.D. ($n= 2$ experimentos independentes em duplicata). As velocidades de formação dos hidroximetabólitos do montelukaste durante a incubação com inibidores estão apresentadas como porcentagem em relação à atividade do controle (na ausência do inibidor em quadruplicata)..... 92

FIGURA 3.15 - Inibição química da formação do montelukaste 1,2 diol a partir do metabolismo do montelukaste (a) 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e (b) 0,02 $\mu\text{mol/L}$. Utilizando como inibidores específicos a quercetina (10 $\mu\text{mol/L}$), sulfafenazol (25 $\mu\text{mol/L}$) e ambos inibidores (quercetina (10 $\mu\text{mol/L}$) + Sulfafenazol (25 $\mu\text{mol/L}$)). Montelukaste (1,0 e 0,02 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado na presença dos inibidores químicos, HLMS (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 30min a 37 °C. As velocidades de formação dos hidroximetabólitos do montelukaste durante a incubação com inibidores estão apresentadas como porcentagem em relação a atividade do controle (na ausência do inibidor em quadruplicata). Os dados de inibição estão apresentados como a média de duplicatas. 94

FIGURA 3.16 – Cromatograma representativo do perfil de separação obtido por LC-MS/MS no modo SRM para montelukaste e seus glucuronídeos provenientes da incubação de montelukaste (1,0 µmol/L) em solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L), HLMS (0,25 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C. coluna Luna C18 (100 x 2,0 mm; 3 µm); fase móvel: acetonitrila/água acidificada (0,1% de ácido fórmico) 82:18 (v/v); vazão de 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 µL. As transições monitoradas estão descritas na Tabela 3.1.....	97
FIGURA 3.17 – Gráficos representativos da linearidade de formação dos glucuronídeos do montelukaste. (a) Curva de tempo de incubação x formação do glucuronídeo. Montelukaste (1,0 µmol/L) foi incubado em solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L), HLMS (0,25 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) à 37 °C. A reação foi terminada em 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 min de incubação. (b) Curva de concentração proteica x formação do glucuronídeo. Montelukaste (1,0 µmol/L) em solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L), HLMS (0,0 – 1,0 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C.	98
FIGURA 3.18 – Perfil cinético representativo da glucuronidação montelukaste em dois HLMS. Concentrações crescentes de montelukaste (0-25 µmol/L) foram incubadas com HLMS (0,25 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min a 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações.....	99
FIGURA 3.19 – Gráficos de Eadie-Hofstee para a glucuronidação do montelukaste em duas preparações de HLMS.....	100
FIGURA 3.20 - Velocidade de formação do montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo em um panel de 13 isoformas expressas de UGTs. Montelukaste (1,0 µmol/L) foi incubado com cada isoforma expressa de UGT (0,025 mg/mL) na presença de solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C.....	102
FIGURA 3.21 - Perfil cinético representativo da formação do montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo a partir da glucuronidação do montelukaste utilizando a isoforma expressa UGT1A3. Concentrações crescentes de montelukaste (0-20 µmol/L) foram incubadas com isoforma expressa de UGT1A3 (0,025 mg/mL) na presença de solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações.....	103
FIGURA 3.22 – Contribuição dos metabólitos do montelukaste; montelukaste 1,2 diol (M6), 21(R)-OH montelukaste (M5a), 21(S)-OH montelukaste (M5b), 25-OH montelukaste (M3), montelukaste acil-β-D-glucuronídeo (M1) e M-glucuronídeo (M-gluc); no Cl _{int} <i>in vitro</i> aparente. Média: representa a média de duplicatas de incubações em duas preparações de HLMS (Cl _{int} : µL/min/mg protein). % Cl _{int} total: contribuição de cada metabólito (%) no Cl _{int} aparente total do monteculaste (via CYPs e UGTs).....	104

FIGURA 3.23 – Representação esquemática das rotas metabólicas do montelucaste via CYPs e UGTs e das enzimas específicas envolvidas. Proposta baseada nos dados do presente estudo e em dados da literatura.^{168,170,171} 105

RESUMO

“Identificação Estrutural de Metabólitos Provenientes do Metabolismo *in vitro* de Compostos Bioativos e Estudos de Fenotipagem Enzimática”. Este trabalho relata estudos de metabolismo *in vitro* envolvendo o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF-PT-31), um novo agonista adrenérgico α_{2A} , e estudos de fenotipagem enzimática do montelucaste, fármaco utilizado no tratamento da asma. Os resultados do presente estudo revelaram que LPSF-PT-31 é metabolizado via CYP P450s em microsomas de fígado de ratos e humanos, produzindo apenas um hidroximetabólito principal. LPSF-PT-31 apresentou uma maior taxa de metabolismo *in vitro* em ratos, o que sugere uma maior exposição ao fármaco em seres humanos. A identificação estrutural do metabólito do LPSF-PT-31 foi estabelecida através de análises por LC-MSⁿ e ¹H-RMN, o que indicou que a reação de hidroxilação ocorreu na posição 5 do anel da imidazolidina levando a produção do metabólito 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-hidroxi-imidazolidina-2,4-diona. Em relação aos estudos de fenotipagem enzimática do montelucaste foi observado que a glucuronidação é o principal mecanismo de eliminação deste fármaco, representando ~85% do Cl_{int} *in vitro* aparente total (CYPs +UGTs) e que a oxidação via CYPs representa somente ~15% do Cl_{int} *in vitro*, sendo os metabólitos majoritários formados via UGTs e CYPs o montelucaste acil- β -D-glucuronídeo e o montelucaste 1,2 diol, respectivamente. Estudos cinéticos, de correlação com a atividade enzimática, de inibição e empregando CYPs e UGTs expressas indicaram que as CYP2C9 e CYP2C8 estão comparavelmente envolvidas na formação do montelucaste 1,2 diol. A CYP3A4 foi responsável pela formação dos metabólitos 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste, enquanto múltiplas CYPs catalisam a formação do 25-OH montelucaste (CYP2C8>2C9>3A4>2C19). A glucuronidação direta do montelucaste resultou na formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo e de um novo metabólito (M-glucuronídeo) não reportado previamente e foi catalisada exclusivamente pela isoforma UGT1A3. Deste modo, os dados *in vitro* sugerem que a aplicabilidade do montelucaste como marcador da CYP2C8 *in vitro* e *in vivo* pode ser severamente comprometida devido ao importante papel da UGT1A3 e o envolvimento de múltiplas CYPs no seu metabolismo. Ainda, considerando a falta de marcadores seletivos para a UGT1A3, montelucaste pode ser utilizado como um marcador seletivo da UGT1A3 *in vivo* e *in vitro*.

ABSTRACT

“Structural Identification of Metabolites from *In Vitro* Metabolism of Bioactive Compounds and Studies of Enzymatic Phenotyping”. This work reports studies of *in vitro* metabolism involving the compound 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione (LPSF-PT-31), a new α_2 -adrenoceptor agonist and, studies of enzyme phenotyping of montelukast, a drug used for the treatment of asthma. The results of this study revealed that LPSF-PT-31 is metabolized via CYP P450s in rat and human liver microsomes, producing only one major hydroxy-metabolite. LPSF-PT-31 showed a higher rate of *in vitro* metabolism in rats, which suggests a greater exposure to the drug in humans. The structural identification of LPSF-PT-31 metabolite's was achieved through LC-MSⁿ and ¹H-NMR analysis that provided data to conclude that the hydroxylation occurred in the 5th position of the imidazolidine ring yielding to the production of 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-hydroxyimidazolidine-2,4-dione. Related to the studies of enzyme phenotyping of montelukast, it was observed that the glucuronidation is the main clearance pathway of montelukast accounting for ~85% of the total apparent *in vitro* Cl_{int} (CYPs +UGTs) and that the CYP-mediated oxidation accounts only for ~15% to the overall metabolism of the drug, being montelukast acyl- β -D-glucuronide and montelukast 1,2 diol the major metabolites formed via UGTs and CYPs, respectively. Kinetic studies, correlation analysis, inhibition studies and, experiments in expressed CYPs and UGTs revealed that the CYP2C9 and CYP2C8 are comparably involved in the formation of montelukast 1,2-diol. CYP3A4 was responsible for the formation of 21(R)-OH montelukast and 21(S)-OH montelukast, while multiple CYPs catalyzed the formation of 25-OH montelukast (CYP2C8>2C9>3A4>2C19). The direct glucuronidation of montelukast resulted in the formation of montelukast acyl- β -D-glucuronide and of a new metabolite (M-glucuronide) not reported previously and was exclusively catalyzed by isoform UGT1A3. In conclusion, the *in vitro* data suggest that the applicability of montelukast as a probe of CYP2C8 activity *in vitro* and *in vivo* may be severely compromised due to important role of UGT1A3 and involvement of multiple CYPs in its metabolism. In addition, considering the lack of selective markers for UGT1A3, montelukast may be used as a selective marker of the UGT1A3 *in vitro* and *in vivo*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVI
SUMÁRIO.....	XVII
CAPÍTULO 1.....	1
1. Metabolismo <i>In Vitro</i> de Fármacos: Fundamentos Teóricos	1
1.1. Metabolismo <i>in vitro</i> de fármacos.....	1
1.1.1. Modelos de biotransformação <i>in vitro</i>	3
1.1.2. Sistema enzimático Citocromo P450.....	4
1.1.3. Uridina 5'-difosfato glucoronosiltransferases (UGTs)	8
1.2. Reações de fenotipagem enzimática	10
1.3. Identificação estrutural de metabólitos por técnicas analíticas de LC-MS e RMN	12
CAPÍTULO 2.....	15
2. Metabolismo <i>In Vitro</i> de um Novo Agonista Adrenérgico α_2 : Identificação e Caracterização dos Metabólitos Formados por LC-MS ⁿ e RMN	15
2.1. Agonistas adrenérgicos α_2	15
2.2. Procedimento experimental.....	17
2.2.1. Materiais.....	17
2.2.2. Obtenção das frações microsossomais	19
2.2.2.1. Preparo da solução tampão fosfato salino (PBS).....	19
2.2.2.2. Extração das frações microsossomais.....	19
2.2.3. Determinação da concentração proteica das frações microsossomais.....	20
2.2.3.1. Preparo das soluções de albumina sérica bovina (BSA).....	20
2.2.3.2. Preparo do reagente de Bradford.....	21
2.2.3.3. Determinação da concentração proteica das frações microsossomais por medidas espectrofotométricas das amostras	21
2.2.4. Condições analíticas para a determinação do LPSF-PT31 por LC-MS.....	21
2.2.5. Otimização das condições de incubação	23
2.2.5.1. Preparo da solução tampão fosfato de potássio monobásico	23

2.2.5.2. Preparo da solução de NADPH.....	23
2.2.5.3. Preparo do sistema gerador de NADPH.....	23
2.2.5.4. Condições iniciais do metabolismo <i>in vitro</i> do LPSF-PT-31	23
2.2.5.5. Planejamento fatorial 2 ⁴	24
2.2.6. Condições otimizadas do metabolismo <i>in vitro</i> do LPSF-PT-31.....	25
2.2.7. Condições de metabolismo <i>in vitro</i> do LPSF-PT-31 em larga escala: isolamento do metabólito do LPSF-PT-31.....	26
2.2.8. Condições experimentais para análise por RMN	27
2.3. Resultados e Discussão	28
2.3.1. Determinação da concentração proteica das frações microsossomais.....	28
2.3.2. Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas.....	29
2.3.3. Planejamento fatorial 2 ⁴	31
2.3.4. Metabolismo <i>in vitro</i> do LPSF-PT-31 e identificação do metabólito formado por LC-MS ⁿ	35
2.3.5. Identificação estrutural do metabólito do LPSF-PT-31 por RMN.....	44
2.4. Conclusões.....	49
CAPÍTULO 3.....	51
3. Estudos de Fenotipagem Enzimática e Avaliação da Contribuição das Enzimas CYPs e UGTs no Metabolismo do Montelukaste	51
3.1. Montelukaste	51
3.2. Procedimento experimental.....	56
3.2.1. Materiais.....	56
3.2.2. Condições analíticas para a determinação do montelukaste e seus metabólitos por LC-MS.....	57
3.2.3. Otimização das condições de metabolismo <i>in vitro</i> do montelukaste.....	59
3.2.3.1. Preparo da solução tampão fosfato de sódio	61
3.2.3.2. Preparo da solução tampão tris-HCl	61
3.2.3.3. Preparo das soluções de cofatores	61
3.2.3.4. Condições gerais de metabolismo <i>in vitro</i> via CYP P450.....	61
3.2.3.5. Condições gerais de metabolismo <i>in vitro</i> via UGTs.....	62
3.2.3.6. Condições de metabolismo <i>in vitro</i> combinando os cofatores de CYPs e UGTs.....	63
3.2.4. Tratamento das amostras.....	63
3.2.4.1. Preparo da solução saturada de carbonato de sódio	63
3.2.5. Metabolismo <i>in vitro</i> do montelukaste via CYP P450s	63

3.2.5.1. Determinação da linearidade de formação dos metabólitos.....	64
3.2.5.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para o metabolismo oxidativo do montelucaste.....	64
3.2.5.3. Análises de correlação em HLMs.....	65
3.2.5.4. Metabolismo do montelucaste em isoformas de CYPs.....	65
3.2.5.5. Inibição química do metabolismo oxidativo do montelucaste.....	66
3.2.6. Metabolismo <i>in vitro</i> do montelucaste via UGTs.....	67
3.2.6.1. Determinação da linearidade de formação dos glucuronídeos montelucaste.....	68
3.2.6.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para glucuronidação do montelucaste.....	68
3.2.6.3. Metabolismo do montelucaste em isoformas de UGTs.....	69
3.2.7. Tratamento e análise dos dados.....	69
3.3. Resultados e Discussão.....	70
3.3.1. Influência das condições de incubação no metabolismo do montelucaste via CYPs e UGTs.....	70
3.3.2. Metabolismo <i>in vitro</i> do montelucaste via CYP P450s.....	77
3.3.2.1. Determinação da linearidade de formação dos hidroximetabólitos do montelucaste.....	78
3.3.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para o metabolismo oxidativo do montelucaste.....	79
3.3.2.3. Análises de correlação em HLMs.....	83
3.3.2.4. Metabolismo do montelucaste em isoformas de CYPs.....	85
3.3.2.5. Inibição química do metabolismo oxidativo do montelucaste.....	91
3.3.3. Metabolismo <i>in vitro</i> do montelucaste via UGTs.....	95
3.3.3.1. Determinação da linearidade de formação dos glucuronídeos do montelucaste.....	97
3.3.3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para glucuronidação do montelucaste.....	98
3.3.3.3. Metabolismo do montelucaste em isoformas de UGTs.....	101
3.3.4. Contribuição do metabolismo via CYP P450s e UGTs no <i>clearance in vitro</i> do montelucaste.....	103
3.4. Conclusões.....	107
CAPÍTULO 4.....	109
Referências Bibliográficas.....	109
APÊNDICES.....	126

CAPÍTULO 1

1. Metabolismo *In Vitro* de Fármacos: Fundamentos Teóricos

1.1. Metabolismo *in vitro* de fármacos

O metabolismo é um processo de biotransformação onde compostos endógenos e xenobióticos são convertidos a novos compostos mais hidrofílicos (metabólitos) através de reações enzimáticas. O metabolismo de um fármaco ou uma nova entidade química (*New Chemical Entities* – NCEs) pode diminuir sua toxicidade ou atividade terapêutica, favorecendo a eficiência do processo de eliminação (*clearance*) e ainda levar a formação de metabólitos mais ativos, os quais apresentam maior potencial farmacológico ou toxicológico.¹⁻³ Por exemplo, o tamoxifeno; um pró-fármaco utilizado no tratamento do câncer de mama; é metabolizado via CYP2D6 e CYP3A4 formando os metabólitos ativos, N-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno (4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifeno).^{4,5} Deste modo, a investigação sistemática do metabolismo de fármacos ou NCEs desempenha um importante papel na fase inicial do processo de descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos.^{6,7}

Agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁸, *Food and Drug Administration* (FDA)⁹ e *European Medicines Agency* (EMA)¹⁰ recomendam que todas as NCEs em desenvolvimento devam ser caracterizadas em relação as suas propriedades metabólicas antes da administração em seres humanos, uma vez que o perfil metabólico pode ter um impacto significativo na biodisponibilidade, eficiência terapêutica e toxicidade de um fármaco.¹¹

Os estudos de metabolismo *in vitro* realizados previamente ao início de estudos clínicos possibilitam a identificação e caracterização dos metabólitos formados, a identificação das isoformas envolvidas na via metabólica, a avaliação dos riscos de interações medicamentosas envolvendo as NCEs e seus metabólitos;¹²⁻¹⁴ assim como, prever a variabilidade farmacocinética interindividual. DESTA et al. (2007)¹⁵ demonstraram através de estudos de metabolismo *in vitro* que

o polimorfismo genético da CYP2B6, principal via metabólica do efavirenz, influencia significativamente o seu metabolismo, onde o alelo CYP2B6*6 foi associado com a diminuição na expressão e atividade da CYP2B6 e, assim, com a baixa velocidade de formação do 8-hidroxi-efavirenz.

Ainda, estudos de metabolismo possibilitam comparar os resultados obtidos entre diferentes espécies animais e humanos para uma seleção adequada das espécies animais para posteriores estudos de toxicidade, as quais devem apresentar um perfil metabólico semelhante a humanos; possibilitando um melhor planejamento e direcionamento prévio dos estudos pré-clínicos.¹⁶⁻¹⁸ Adicionalmente os estudos de metabolismo *in vitro* de NCEs possibilitam o aprimoramento de um novo candidato a fármaco, baseando-se no seu perfil metabólico. Neste contexto, os estudos de metabolismo *in vitro* são utilizados para a prévia estimativa e predição do metabolismo *in vivo*.^{19,20}

O processo metabólico é convencionalmente classificado em três grupos: reações de fase I, fase II e fase III. As reações de fase I, também denominadas reações de funcionalização, resultam na introdução de um novo grupo funcional, na modificação ou exposição de um grupo funcional existente no fármaco ou NCEs, incluindo reações de oxidação, redução e hidrólise. Estas reações de fase I são mediadas principalmente por enzimas do citocromo P450 (CYPs), flavina monoxigenases, amino oxidases e epóxido hidrolases. Já as reações de fase II representam reações de conjugação, incluindo glucuronidação, sulfatação, acetilação, metilação e conjugação com glutathione, as quais são catalisadas pelas enzimas uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases (UGTs), sulfotransferases (SULT), N-acetil transferases (NAT), metil transferases e glutathione S-transferase (GST), respectivamente. As reações de fase I e II são responsáveis pelo aumento na hidrofobicidade e, conseqüentemente, por facilitar a eliminação do fármaco.^{1,21,22} Dentre estas enzimas, destacam-se as CYPs e UGTs pois estas são as principais responsáveis pelo metabolismo dos fármacos presente no mercado atualmente.²³⁻²⁵ As reações de fase III envolvem proteínas transportadoras de membrana, as quais exercem grande influência nos processos de absorção, distribuição e eliminação de um fármaco, pois são responsáveis pelo transporte da maioria dos fármacos através das membranas celulares e assim pela concentração do fármaco no sítio de biotransformação.²² Neste trabalho serão abordadas as reações metabólicas de fase I e fase II envolvendo CYPs e UGTs, respectivamente.

1.1.1. Modelos de biotransformação *in vitro*

O processo de biotransformação ocorre em muitos tecidos como o fígado, os rins, pele, pulmões e intestino, sendo o fígado o principal sítio de metabolização. Assim, os diferentes modelos de biotransformação *in vitro* são principalmente derivados do fígado, tais como: microsomas, hepatócitos, frações S9, frações citosólicas e enzimas isoladas.^{3,22} As principais vantagens destes sistemas incluem a habilidade de avaliar o processo metabólico de fase I e II individualmente, comparar o metabolismo entre espécies, baixo custo, rápida obtenção de resultados e redução do uso de animais.^{26,27}

As frações microsomais hepáticas são as frações sub-celulares mais amplamente utilizadas para os estudos do metabolismo *in vitro*, principalmente por conter as principais enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos, por exemplo, CYPs e UGTs.²⁸⁻³⁰ Assim, estas frações são utilizadas para avaliar as reações de oxidação e glucuronidação através da adição dos cofatores NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio) e UDPGA (uridina difosfato-ácido glucurônico), respectivamente. Os microsomas consistem em vesículas do retículo endoplasmático de células hepáticas obtidas por centrifugação diferencial a partir de fígados de humanos ou de animais. A fração microsomal é o modelo *in vitro* mais bem caracterizado para estudos de biotransformação e apresenta como principais vantagens a simplicidade de uso, estocagem e manuseio, o baixo custo^{16,18,26} e possibilita a obtenção de dados iniciais do metabolismo *in vitro* de fármacos e NCEs. No entanto, para a predição do metabolismo *in vivo*, deve-se realizar a extrapolação teórica/computacional de dados *in vitro*,^{19,20,31} devido às diversas diferenças entre as condições *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, à ausência das demais enzimas (NAT, GST e SULT) presentes *in vivo* e, conseqüentemente, ausência de competição metabólica entre diferentes enzimas.^{22,26} Adicionalmente, as condições de incubação *in vitro* utilizadas, tais como a força iônica, composição e pH da solução tampão e o efeito de solventes orgânicos usados no sistema de biotransformação podem afetar os resultados obtidos através de estudos de metabolismo utilizando microsomas.^{26,32,33}

Além das frações microsomais, enzimas isoladas são também frequentemente utilizadas nos estudos de biotransformação *in vitro* e de fenotipagem enzimática. As enzimas isoladas podem ser obtidas através da expressão gênica no

retículo endoplasmático de células hospedeiras, por exemplo, a expressão em baculovírus. Este modelo tem como vantagem a possibilidade de avaliar individualmente o metabolismo em cada isoforma de CYPs ou UGTs, podendo definir se uma ou mais isoformas estão envolvidas no metabolismo do fármaco e estimar a contribuição enzimática na rota metabólica. As enzimas isoladas podem ser utilizadas para avaliação de interações medicamentosas e, ainda, devido à disponibilidade de enzimas isoladas com diferentes genótipos de CYPs e UGTs, pode-se também avaliar a influência dos diferentes polimorfismos na biotransformação de um fármaco.^{1,18,22,26,34} A principal desvantagem do uso de enzimas isoladas consiste na baixa representatividade do sistema *in vivo*, uma vez que estes são sistemas simples em comparação às diversas variáveis presentes no complexo sistema *in vivo*.³⁵

1.1.2. Sistema enzimático Citocromo P450

As enzimas do citocromo P450 (CYPs) são hemeproteínas e apresentam sítio ativo constituído de uma ferro-protoporfina IX, onde o átomo de ferro faz seis ligações: quatro ligações com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos, uma ligação com o átomo de enxofre proveniente do resíduo de cisteína situado próximo à região C-terminal da cadeia polipeptídica e uma ligação com uma molécula de água (Figura 1.1). As CYPs apresentam um potencial redox e propriedades espectrais únicas, onde a denominação P450 é baseada na típica absorção em 450 nm quando citocromo P450 (Fe^{2+}) se liga ao monóxido de carbono. Esta propriedade espectral está presente somente quando a CYP está intacta e cataliticamente funcional. Ao contrário, o citocromo P450 na forma inativa apresenta absorção máxima em 420 nm, como as demais hemeproteínas.^{36,37}

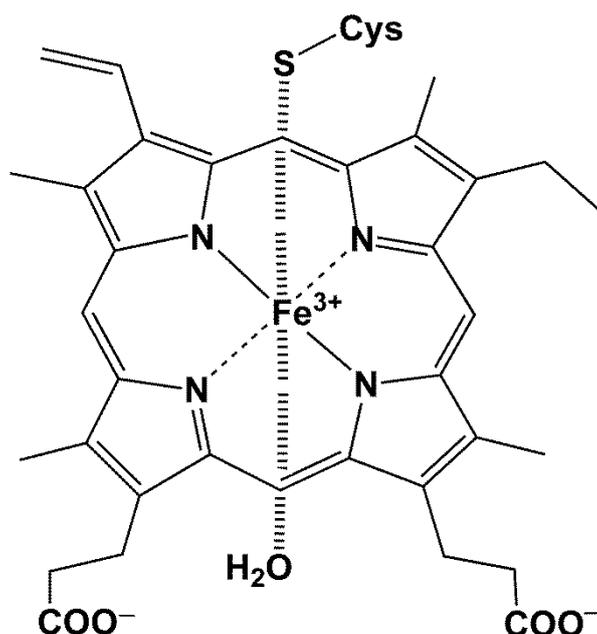
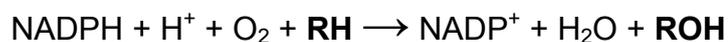


FIGURA 1.1 – Estrutura simplificada do sítio catalítico das enzimas do citocromo P450 (Adaptado SONO et al., 1996).³⁸

As CYPs estão ligadas à membrana do retículo endoplasmático e estão associadas a outras enzimas como citocromo b5 e citocromo P450 redutase, as quais participam do mecanismo catalítico das CYP P450s.³⁹ As reações catalisadas por CYPs ocorrem na presença do cofator NADPH e são denominadas reações de hidroxilação ou monooxigenação devido a habilidade do citocromo P450 mediar a transferência de um átomo de oxigênio para o substrato a partir do oxigênio molecular e reduzir o outro átomo de oxigênio em água, o que resulta em compostos mais hidrofílicos e mais suscetíveis a eliminação ou a posteriores reações de fase II.⁴⁰ A reação catalisada por P450 pode ser sumarizada de acordo com a seguinte equação:



As principais etapas do ciclo catalítico das P450s são consenso na literatura, as quais estão representadas no esquema da Figura 1.2. A catálise inicia-se com a ligação do substrato (RH) ao citocromo P450 na forma oxidada (Fe^{3+}) formando um complexo binário, RH-P450-(Fe^{3+}) (a), o qual é reduzido através de duas etapas sequenciais de oxido-redução, onde o cofator NADPH doa um elétron para o citocromo P450 via uma flavoproteína denominada NADPH-citocromo P450 redutase, que por sua vez reduz o complexo RH-P450-(Fe^{3+}), formando o complexo

RH-P450-(Fe²⁺) (b). Em seguida, o complexo RH-P450-(Fe²⁺) se une ao oxigênio molecular formando o complexo RH-P450-(Fe²⁺)-O₂ (c) que aceita um segundo elétron introduzido pelo NADPH reduzindo o oxigênio molecular e formando um complexo altamente reativo e instável (d). A seguir, ocorre a protonação do complexo resultando na clivagem da ligação O-O (e) e liberação de uma molécula de água (f). Um complexo FeORH³⁺ é formado, seguido da retirada de um átomo de hidrogênio do substrato e transferência de um átomo de oxigênio ao substrato (g). Finalmente, o substrato oxigenado se dissocia, regenerando a forma oxidada do citocromo P450.^{36,41-43}

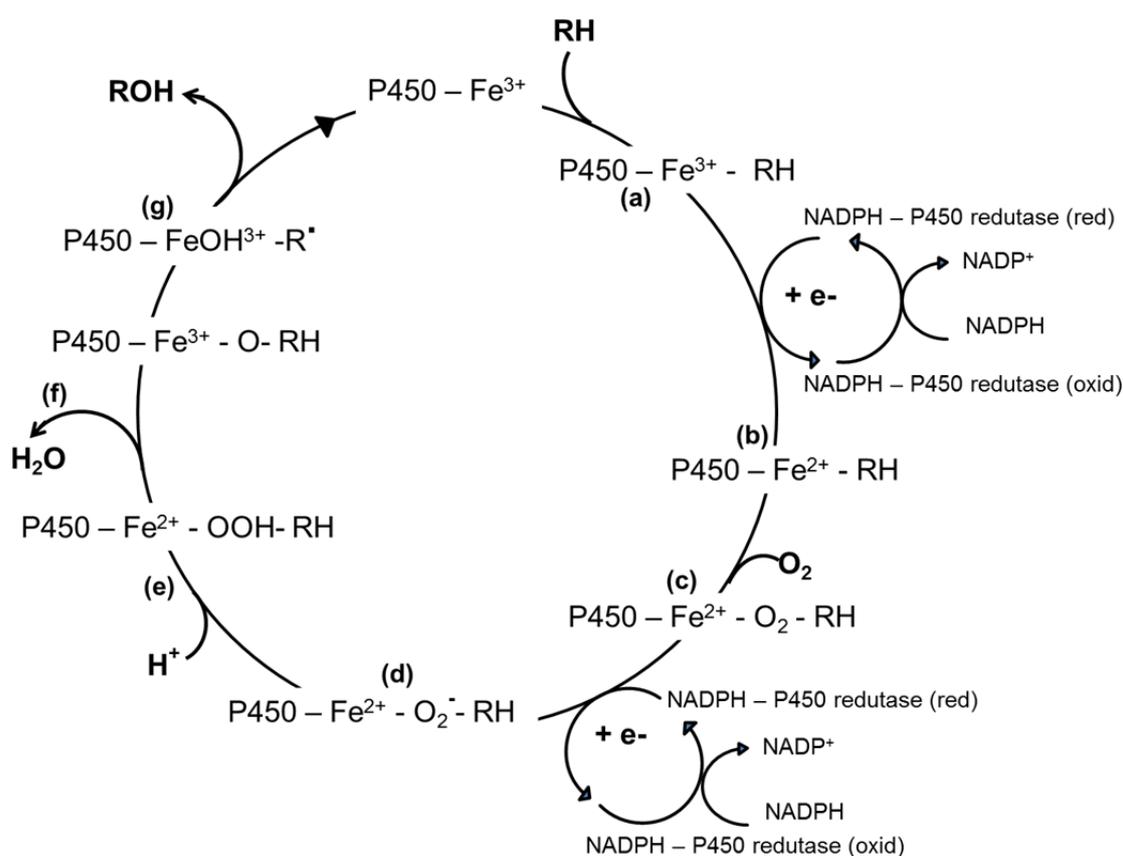


FIGURA 1.2 – Esquema representativo dos aspectos gerais do ciclo catalítico das enzimas do citocromo P450 (adaptado de ISIN e GUENGERICH, 2007).⁴¹ RH: substrato e ROH: metabólito formado.

As enzimas do citocromo P450 são os agentes oxidantes mais potentes *in vivo*, as quais são capazes de catalisar a biotransformação oxidativa de uma vasta gama de substratos exógenos e endógenos. Três famílias de CYPs; CYP1, CYP2 e CYP3; são as principais responsáveis pelo metabolismo de fármacos.^{44,45} As CYPs

estão envolvidas no metabolismo de cerca de 75% dos fármacos atualmente presentes no mercado.²⁵ As principais isoformas envolvidas no metabolismo de fármacos em humanos são: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5. Sendo que quatro destas enzimas, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6, são responsáveis por aproximadamente 80% da biotransformação dos fármacos eliminados via CYPs, conforme ilustrado na Figura 1.3.^{25,46} Deste modo, as enzimas do citocromo P450 são amplamente exploradas nos estudos de metabolismo de fármacos. Substratos e inibidores específicos para as principais isoformas de CYPs humanas têm sido reportados na literatura. A maioria destes compostos está disponível comercialmente e são utilizados rotineiramente na caracterização da atividade enzimática das CYPs humanas e nos estudos de fenotipagem enzimática de fármacos e NCEs.³⁹ A Tabela 1.1 lista exemplos de substratos e inibidores específicos das principais isoformas de CYPs envolvidas no metabolismo de fármacos em humanos.

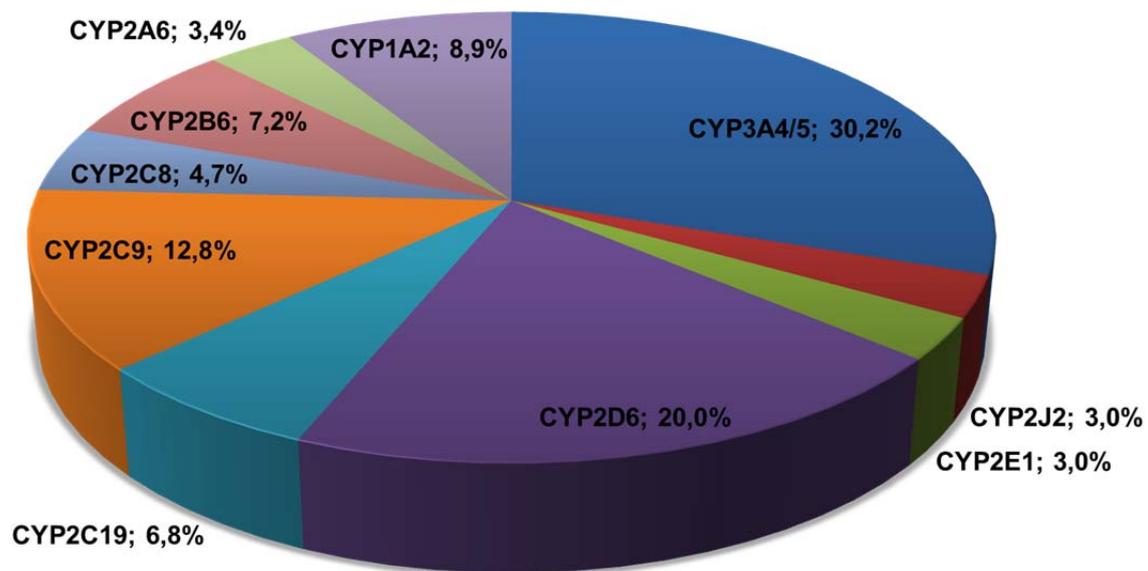


FIGURA 1.3 - Representação esquemática das diferentes contribuições das isoformas de CYPs no metabolismo de 248 fármacos clinicamente utilizados, com metabolismo majoritariamente via CYP P450s (adaptado de ZANGER et al., 2013).⁴⁶

TABELA 1.1 - Lista exemplos de substratos e inibidores específicos das principais isoformas de CYPs envolvidas no metabolismo de fármacos em humanos³⁹

CYPs	Substrato Marcador	Metabólito monitorado	Inibidor
CYP1A2	fenacetina	acetaminofeno	furafilina ⁴⁷
CYP2A6	cumarina	7'-hidroxi-cumarina	letrozol, ⁴⁸ pilocarpina ⁴⁹
CYP2B6	bupropiona	hidroxi-bupropiona	tiotepa ⁵⁰
CYP2C8	paclitaxel	6 α -hidroxi- paclitaxel	quercetina, ⁵¹ trimetoprima ⁵²
CYP2C9	diclofenaco	4-hidroxi-diclofenaco	sulfafenazol ⁵³
CYP2C19	S-mefenitoína	4-hidroxi-mefenitoína	ticlopidina, ⁵⁴ omeprazol
CYP2D6	dextrometorfano	dextorfano	quinidina ⁵⁵
CYP2E1	clorzoxazona	6-hidroxi-clorzoxazona	dietilditiocarbamato ⁵⁶
CYP3A4	testosterona	6- β -hidroxi-testosterona	cetoconazol ⁵³ troleandomicina ⁵⁶

1.1.3. Uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferases (UGTs)

As UGTs catalisam a transferência de uma molécula de ácido glucurônico para um xenobiótico ou metabólito proveniente das reações de biotransformação de fase I contendo grupos funcionais nucleofílicos, tais como ácidos carboxílicos, carbonila, álcool e aminas; tornando estes compostos mais polares e suscetíveis a excreção via urina ou bile.^{57,58} A reação de glucuronidação ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem e envolve a formação de uma ligação covalente entre ácido glucurônico, proveniente do cofator UDPGA, e o substrato que contém o grupo funcional adequado.^{57,59} A reação catalisada por UGTs pode ser esquematicamente resumida de acordo com a Figura 1.4.

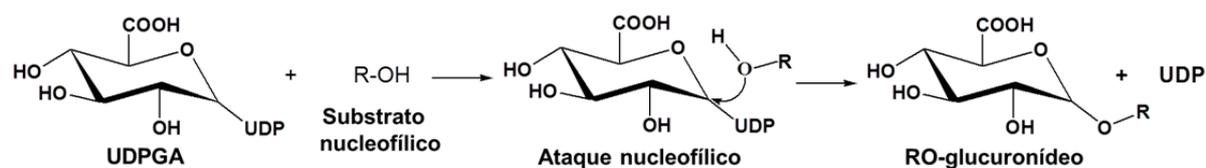


FIGURA 1.4 – Representação esquemática da reação enzimática catalisada por UGTs (adaptado de GUILLEMETTE et al., 2014).²⁴

O sítio ativo das enzimas UGTs é localizado no lúmen do retículo endoplasmático, o que resulta em uma barreira à passagem dos substratos, cofatores e produtos através da membrana do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, em uma redução da atividade enzimática das UGTs.^{33,60,61} Deste modo, para o estudo de reações metabólicas via UGTs *in vitro*, além da adição do cofator UDPGA é necessário à adição de aditivos para aumentar o acesso do substrato e cofatores ao sítio ativo das UGTs. Com este propósito, a alameticina; um antibiótico nonadecapeptídeo cíclico produzido por cepas de *Trichoderma viride* tem sido adicionada às incubações microssomais a fim de maximizar a atividade catalítica, através da formação de poros na membrana do retículo endoplasmático sem nenhum efeito na estrutura proteica das UGTs.⁶¹⁻⁶³ Conseqüentemente, essa particularidade das UGTs torna a extrapolação dos dados de metabolismo *in vitro* via UGTs para predição do metabolismo *in vivo* menos robusta do que a extrapolação dos dados de metabolismo via CYPs.³⁵

A glucuronidação é a principal reação de metabolismo de fase II, sendo esta envolvida no metabolismo de cerca de 35% dos fármacos atualmente presentes no mercado.^{23,24} As principais UGTs envolvidas no metabolismo hepático de fase II em humanos são as enzimas UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B15 e UGT2B17. As isoformas UGT1A coletivamente são responsáveis pela conjugação de aproximadamente 55% dos fármacos que sofrem glucuronidação.^{24,59}

Ao contrário das CYPs, marcadores e inibidores específicos para os estudos de metabolismo envolvendo UGTs não são bem definidos na literatura devido à sobreposição de especificidades de substrato das UGTs, ou seja, um substrato específico pode ser metabolizado por várias UGTs; ainda os inibidores descritos apresentam baixa seletividade, por exemplo, o gemfibrozil atua como inibidor não seletivo, pois inibe tanto a UGT1A1 quanto a UGT1A3.^{64,65} Deste modo, os estudos de fenotipagem enzimática e interações medicamentosas *in vitro* são majoritariamente direcionados por UGTs expressas.^{9,66-68} A Tabela 1.2 lista alguns exemplos de marcadores e inibidores para as principais isoformas de UGTs envolvidas no metabolismo hepático de fase II em humanos.

TABELA 1.2- Exemplos de marcadores e inibidores para as principais isoformas de UGTs envolvidas no metabolismo hepático de fase II em humanos^{24,69,70}

UGTs	Substrato Marcador	Metabólito monitorado	Inibidor
UGT1A1	β -estradiol ⁶³	β -estradiol-3-glucuronídeo	atazanavir, ⁷¹ gemfibrozil ⁶⁴
UGT1A3	fulvestranto ⁷²	fulvestranto-glucuronídeo	buprenorfina, ⁷³ gemfibrozil ⁶⁵
UGT1A4	trifluoperazina ⁷⁴	trifluoperazina-N-glucuronídeo	hecogenina, ⁷⁴ efavirenz ⁷⁵
UGT1A6	serotonina ⁷⁶	serotonina-O-glucuronídeo	celastrol ⁷⁷
UGT1A7	octilgalato ⁶⁹	octilgalato-glucuronídeo	fenilbutazona ⁷⁴
UGT1A8	dihidroxi-testosterona ⁷⁸	dihidroxi-testosterona glucuronídeo	emodina ⁷⁹
UGT1A9	propofol ⁸⁰	propofol-O-glucuronídeo	ácido niflúmico, ⁸¹ efavirenz ⁷⁵
UGT1A10	dopamina ⁸²	dopamina-glucuronídeo	emodina ⁷⁹
UGT2B7	zidovudina ⁸³	zidovudina-5'-glucuronídeo	fluconazol, ⁸⁴ celastrol ⁷⁷
UGT2B15	(S)-oxazepam ⁸⁵	(S)-oxazepam-glucuronídeo	ibuprofeno ⁸⁶

1.2. Reações de fenotipagem enzimática

O processo de identificação das enzimas envolvidas na biotransformação de um fármaco ou candidato a fármaco é usualmente denominado reações ou estudos de fenotipagem enzimática.⁸⁷ Esta informação é essencial para a compreensão da contribuição das várias isoformas de CYP P450 e/ou UGTs na eliminação de NCEs. Os estudos de fenotipagem *in vitro* são de fundamental importância para a compreensão de dados farmacocinéticos *in vivo*, na predição do potencial de interações medicamentosas e variações nos efeitos terapêuticos e adversos em indivíduos com polimorfismo genético.⁸⁸⁻⁹³ A reação de fenotipagem é uma estimativa semiquantitativa da contribuição das enzimas no metabolismo de uma NCEs.⁶⁹

Três abordagens de reação de fenotipagem *in vitro* podem ser utilizadas para determinar o envolvimento das CYPs e UGTs e a extensão de suas contribuições no metabolismo de NCEs: (a) inibidores químicos e/ou inibição por anticorpos; (b) uso de enzimas isoladas e (c) estudos de correlação. Cada uma dessas abordagens apresenta vantagens e desvantagens e a combinação destas é usualmente

requerida para identificar precisamente a isoforma envolvida no metabolismo de uma NCEs.^{17,69,89,92}

Os estudos de inibição consistem na avaliação da reação metabólica de interesse na presença e ausência de inibidores específicos das isoformas de CYPs e/ou UGTs. Esta abordagem é mais direta, especialmente quando múltiplas isoformas de CYPs estão envolvidas, no entanto, o emprego de anticorpos inibidores não é tão comum quando comparados com o emprego dos inibidores químicos. O uso de inibidores químicos apresenta como principais vantagens o baixo custo, disponibilidade comercial e estabilidade quando comparado ao emprego de anticorpos. Adicionalmente, os inibidores químicos são seguros, altamente seletivos às enzimas CYP P450, podendo ser usados *in vitro* ou *in vivo* para avaliar o papel de uma CYP específica no metabolismo de agentes terapêuticos.^{90,92} No entanto, os inibidores químicos também apresentam desvantagens se utilizados inapropriadamente. Os inibidores químicos devem ser utilizados cautelosamente porque estes podem inibir mais de uma enzima. Os solventes utilizados no preparo das soluções contendo os inibidores podem também ocasionar inibição e, ainda, os inibidores de algumas enzimas CYP P450 são ativadores de outras, assim é de extrema importância a escolha adequada dos inibidores e de preferência utilizar inibidores recomendados por organizações reguladoras (Tabela 1.1).^{9,89,92,94}

O uso de enzimas isoladas consiste na avaliação da formação do metabólito em um painel de enzimas isoladas, constituído pelas principais CYPs e UGTs envolvidas no metabolismo dos fármacos, e na determinação da velocidade de formação do metabólito (nmol/mim/pmol of P450). Ou seja, consiste em determinar se a enzima é capaz de catalisar ou não a formação do metabólito de interesse. Adicionalmente, podem ser realizados ensaios de concentração-resposta a fim de avaliar os parâmetros cinéticos de formação do metabólito de interesse e avaliar a contribuição relativa das isoformas envolvidas, nos casos em que mais de uma enzima está envolvida na catálise.^{35,39,69,95}

As análises de correlação consistem na avaliação da correlação da velocidade de formação dos metabólitos na reação de interesse com a atividade enzimática individual das CYPs, determinada frente ao marcador específico. As análises de correlação são realizadas através de um painel de amostras de microsomas de fígado a partir de doadores individuais, caracterizadas em relação aos níveis de atividade enzimática das isoformas de CYPs.^{39,69,95}

Deve-se ressaltar que nenhuma destas abordagens individualmente é adequada para a identificação das enzimas envolvidas na biotransformação de NCEs. Assim, nos estudos de fenotipagem tem sido recomendado que pelo menos duas abordagens, com uma delas sendo uso de inibidores seletivos, devem ser utilizadas. Se a interpretação destas duas abordagens é consistente, a terceira abordagem não é necessária. Caso contrário, a terceira abordagem deve ser realizada, e a interpretação final dos dados deve ser baseada nas duas abordagens que forneçam resultados condizentes.^{69,96} No entanto, os estudos de fenotipagem para reações de glucuronidação são geralmente limitadas ao uso de enzimas isoladas devido à indisponibilidade de inibidores e marcadores específicos para UGTs.³⁵

1.3. Identificação estrutural de metabólitos por técnicas analíticas de LC-MS e RMN

A investigação sistemática do metabolismo de NCEs é uma etapa indispensável no desenvolvimento de fármacos, nas etapas pré-clínicas e nos estudos de interações medicamentosas. Assim, a identificação e caracterização prévia dos metabólitos provenientes do metabolismo de NCEs é fundamental, devido à possível atividade farmacológica dos mesmos ou, até mesmo, a sua elevada toxicidade, o que pode resultar na subterapia e no aumento de efeitos colaterais indesejados quando terapêuticamente administrados.⁹⁷

Neste contexto, para identificação e elucidação estrutural de metabólitos a partir do metabolismo *in vitro* de NCEs, métodos analíticos com alta sensibilidade e seletividade são requeridos. Assim, o uso da espectrometria de massas (MS) acoplada à cromatografia líquida (LC-MS) e o emprego de ressonância magnética nuclear (RMN) são fundamentais na caracterização estrutural de metabólitos.²¹

O LC-MS é geralmente a técnica analítica de escolha devido às vantagens do MS em relação ao RMN; onde o LC-MS combina a capacidade de separação da cromatografia líquida (LC) para diferentes classes de compostos com as vantagens do MS, o qual possibilita a determinação da massa molecular dos metabólitos formados, bem como o seu perfil de fragmentação. Adicionalmente, sistemas de MS apresentam maior sensibilidade e requerem menores volumes/concentração das amostras quando comparado aos ensaios com RMN. Neste sentido, esta é uma

vantagem de extrema importância nos estudos de metabolismo de fármacos, uma vez que a quantidade de metabólito formado nos ensaios é geralmente muito reduzida.^{6,98,99}

A identificação estrutural de metabólitos utilizando LC-MS é inicialmente baseada na diferença de massa entre substrato e metabólitos formados, ou seja, no incremento de massa do substrato e pela comparação do perfil de fragmentação destes compostos. Por exemplo, para as reações metabólicas mais comuns de fase I e II observa-se um acréscimo de 16 e 176 Da à massa do substrato, referente a uma reação de oxidação e glucuronidação, respectivamente. A comparação dos padrões de fragmentação do substrato e do metabólito possibilita identificar a região alterada na molécula de substrato através da reação metabólica, onde se espera a presença de um íon produto característico da região não alterada da molécula no espectro obtido para o substrato e metabólito e também a presença de um íon produto, não presente no espectro de massas do substrato, referente à região alterada da molécula e, assim, característico do metabólito.¹⁰⁰⁻¹⁰² LAFAILLE et al. (2014)¹⁰³ demonstrou a aplicabilidade da técnica de LC-MS na determinação das estruturas dos metabólitos desconhecidos resultantes do metabolismo *in vitro* de um novo fármaco anticancerígeno pertencente a série dos imidazo[1,2-a]quinoxalina, onde foram identificados quatro metabólitos de fase I e três metabólitos de fase II através da comparação do perfil cromatográfico, do incremento de massa e pelo estudo do padrão de fragmentação (MS^2) do substrato.

No entanto, os padrões de fragmentação nem sempre são simples e apesar de todos os avanços na espectrometria de massas e o desenvolvimento de softwares para facilitar a elucidação estrutural baseada nos dados de fragmentação, o MS possui algumas limitações em relação à completa elucidação estrutural de um metabólito desconhecido, principalmente quando as espécies em análise são isômeros que produzem o mesmo perfil de fragmentação. Assim, análises por RMN são geralmente requeridas para a completa elucidação estrutural destas novas moléculas, pois este permite diferentes tipos de experimentos em 1D e 2D e, portanto, a obtenção de um grande número de informações para uma completa identificação estrutural e configuração absoluta da molécula, relevantes para os estudos de relação estrutura-atividade.^{21,104,105}

Como dito anteriormente, embora o RMN seja uma excelente técnica para identificação estrutural, a sua principal limitação em termos de identificação

estrutural de metabólitos é a sua baixa sensibilidade. Assim, para viabilizar as análises por RMN é comumente necessário a realização de experimentos em larga escala, com o isolamento do metabólito em escala semipreparativa ou preparativa para a obtenção de concentração suficiente da amostra para os ensaios por RMN. Alternativamente também pode ser empregada a técnica de cromatografia líquida acoplada a ressonância magnética nuclear com a concentração de amostras via extração em fase sólida para posterior análise por RMN (LC-SPE-RMN). Com isso, elimina-se a necessidade do isolamento prévio dos compostos de interesse através de cromatografia preparativa, uma vez que a concentração da amostra pode ser obtida por injeções sucessivas da amostra no LC, com a retenção seletiva das bandas cromatográficas de interesse no sistema de SPE e posterior análise online ou offline por RMN.^{106,107}

Deste modo, visando eficiência no processo de identificação estrutural de metabólitos, a combinação das técnicas analíticas de LC-MS e RMN são frequentemente utilizadas.^{21,104,108} CAI et al. (2007)¹⁰⁹ relatou o estudo de metabolismo *in vitro* do temsirolimus; um agente antineoplásico; onde seis metabólitos foram identificados utilizando a combinação das técnicas de LC-MS e RMN. Nesse trabalho, devido a complexidade estrutural da molécula de temsirolimus presente na forma de isômeros em solução, a identificação estrutural dos metabólitos baseando-se apenas nos dados de LC-MS não foi possível.

Considerando a relevância da identificação de metabólitos e da determinação das principais enzimas envolvidas na rota metabólica de um novo fármaco, o presente trabalho se divide em duas etapas: (1) Identificação e caracterização dos metabólitos formados a partir do metabolismo *in vitro* de um novo agonista adrenérgico α_2 , descrito no Capítulo 2 e (2) Estudos de fenotipagem enzimática e avaliação da contribuição das enzimas CYPs e UGTs no metabolismo do montelucaste, descrito no Capítulo 3.

CAPÍTULO 2

2. Metabolismo *In Vitro* de um Novo Agonista Adrenérgico α_2 : Identificação e Caracterização dos Metabólitos Formados por LC-MSⁿ e RMN

2.1. Agonistas adrenérgicos α_2

Os receptores adrenérgicos ou adrenoceptores α_2 são receptores transmembranas compostos de proteínas-G que se ligam seletivamente a mediadores endógenos ou moléculas exógenas,^{110,111} desempenhando várias funções fisiológicas mediadas por diferentes subtipos de adrenoceptores α_2 . Os receptores adrenérgicos α_2 são classificados em três subtipos: α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} ,^{112,113} os quais são responsáveis por ações específicas dos agonistas adrenoceptores α_2 . Os agonistas do subtipo α_{2A} são mediadores da resposta sedativa, analgésica e anestésica.^{114,115} Os agonistas dos α_{2B} suprimem o tremor, promovem a analgesia na medula espinal e induzem vasoconstrição nas artérias periféricas e, conseqüentemente, causam a resposta hipertensiva a curto prazo;^{112,115} enquanto o receptor α_{2C} está associado com a modulação cognitiva sensorial e atividade locomotora induzida por estímulo.^{111,116}

De modo geral, os agonistas adrenérgicos α_2 constituem uma classe de fármacos que produzem diversos efeitos clínicos provenientes da interação com adrenoceptores α_2 , exercendo um importante papel na analgesia, ansiólise e sedação.^{113,115,117} Clonidina (Figura 2.1), o primeiro fármaco agonista adrenérgico α_2 foi sintetizado por Stähle no início dos anos 1960 e foi inicialmente utilizado como descongestionante nasal, no entanto, em 1966 a clonidina foi introduzida como um fármaco anti-hipertensivo. Ao longo dos anos, a clonidina ganhou aceitação não só no tratamento de hipertensão, mas também como fármaco adjuvante (medicação secundária) no tratamento de isquemia miocárdica, dores crônicas e anestesiologia.^{113,115,118} Em 1999, a dexmedetomidina (Figura 2.1), um potente e altamente seletivo fármaco agonista adrenérgico α_2 , foi aprovada como um sedativo

intravenoso e também como fármaco adjuvante na anestesiologia.^{117,119,120} A dexmedetomidina é o agonista adrenérgico α_2 mais recentemente desenvolvido e comercializado e, apesar de ser quimicamente análogo à clonidina, é aproximadamente oito vezes mais específico aos adrenoceptores α_2 ; tornando-o mais eficaz.¹²¹

Tradicionalmente, o tratamento de dores crônicas inclui o uso de opióides, fármacos que atuam no sistema nervoso central, sendo a morfina um dos mais popularmente conhecidos. A morfina apesar de ser amplamente utilizada apresenta diversos efeitos colaterais indesejados, como por exemplo, constipação intestinal, náuseas e vômitos e, ainda, sedação e depressão respiratória em doses elevadas.¹²² Assim, a administração concomitante de fármacos adjuvantes tem sido utilizada a fim de reduzir estes efeitos colaterais e maximizar a eficácia terapêutica.¹²³ Relatos clínicos e experimentais têm demonstrado a combinação bem sucedida da morfina com agonistas adrenérgicos α_2 atuando como fármacos adjuvantes^{124,125} para controlar a dor neuropática e dores resistentes à morfina.

Desta forma, os agonistas adrenérgicos α_2 têm sido utilizados como fármacos adjuvantes para melhorar a eficácia terapêutica e prolongar a ação dos fármacos utilizados para o tratamento da dor, como por exemplo, a morfina.^{115,126,127} A principal vantagem da utilização simultânea de um fármaco adjuvante é a redução da dose e frequência de administração do fármaco principal, minimizando assim os efeitos colaterais indesejados.¹²⁶⁻¹²⁸ Neste contexto, desde a descoberta da clonidina, os agonistas adrenérgicos α_2 tornaram-se um importante grupo de fármacos na medicina, particularmente na anestesiologia e na terapia da dor. No entanto, poucos medicamentos com este perfil farmacológico estão disponíveis e, portanto, estudos relacionados ao desenvolvimento destes fármacos são de extrema relevância.

O 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF-PT-31) (Figura 2.1), é um novo agonista adrenérgico α_{2A} , análogo da clonidina e da dexmedetomidina, sintetizado em 2010 por Rocha Pitta e colaboradores.¹²⁹ O LPSF-PT-31 possui atividade antinociceptiva dependente da dose, através da ativação de receptores adrenérgicos α_{2A} e mostrou interação sinérgica com a morfina. Adicionalmente, o LPSF-PT-31 demonstrou resultados onde promoveu uma maior estabilidade da pressão sanguínea e do ritmo cardíaco quando comparado à clonidina. Portanto, devido as suas importantes propriedades farmacológicas, o

LPSF-PT-31 é um composto promissor para ser administrado como fármaco adjuvante no tratamento de dores crônicas.¹²⁹

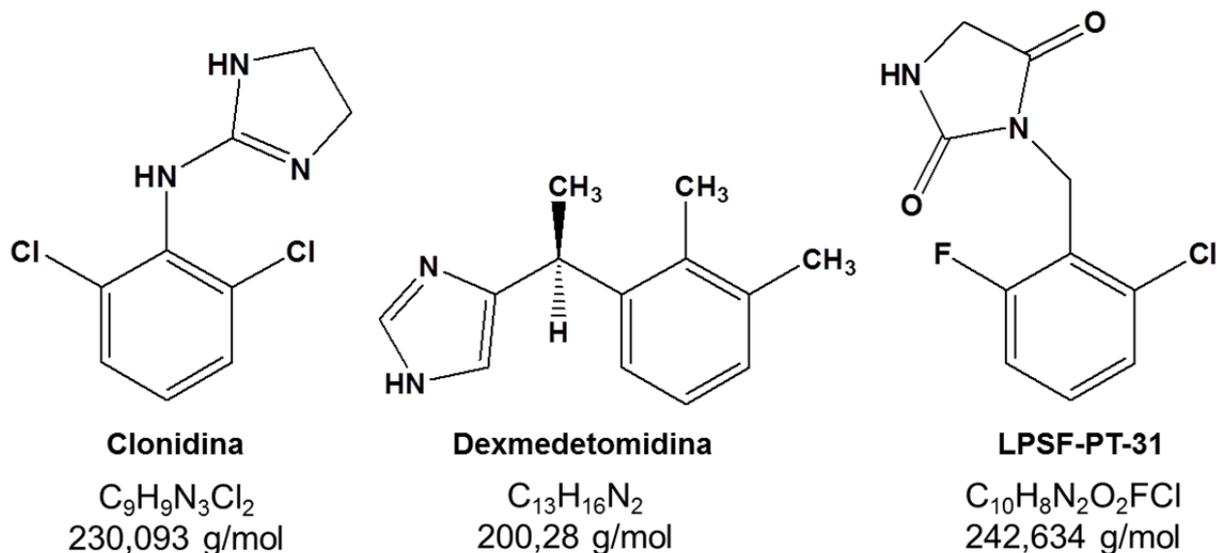


FIGURA 2.1- Estrutura química da clonidina, dexmedetomidina e LPSF-PT-31.

Apesar do potencial analgésico e propriedades sedativas de LPSF-PT-31, até o momento, não foi relatado nenhum estudo investigativo do seu metabolismo, o qual possibilitasse obter informações do perfil metabólico para posteriores estudos farmacocinéticos e também para estimar o impacto dos metabólitos formados na eficácia, toxicidade e eliminação da molécula em estudo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi conduzir um estudo de metabolismo *in vitro* com o LPSF-PT-31 a fim de identificar e caracterizar os principais metabólitos provenientes de reações metabólicas de fase I do LPSF-PT-31, utilizando frações microsomais de fígado de rato (RLMs) e de fígado humano (HLMs), através do emprego de técnicas analíticas de LC-MSⁿ e RMN.

2.2. Procedimento experimental

2.2.1. Materiais

O composto LPSF-PT-31 foi sintetizado e caracterizado pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), coordenado pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta. A purificação e identificação

das impurezas do LPSF-PT-31 foi realizada previamente aos estudos de metabolismo *in vitro* por CARDOSO et al. (2013).¹³⁰

Glicose 6-fosfato, Glicose 6-fosfato desidrogenase, cloreto de magnésio, β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH), albumina sérica bovina (BSA), fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) e acetato de amônio foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Sacarose e o corante *Comassie Brilliant Blue* foram obtidos da Mallinckrodt Baker (St. Louis, MO, EUA).

Fosfato de potássio monobásico e dibásico e ácido fosfórico 85% foram obtidos da J.T. BAKER.

Os fígados de ratos foram doados pelo Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba e pela Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araraquara. O trabalho proposto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos.

Durante a extração microssomal os fígados foram homogeneizados com um homogeneizador IKA, modelo ULTRA-TURRAX T10. As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga JOUAN B4i/BR4i e uma ultracentrífuga HITACHI himac modelo CP90WX.

As determinações de concentração proteica da fração microssomal foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro JASCO V-630, com uma cela de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

As frações microssomais de fígado de humano (pool de 50 doadores) foram obtidas da InvitrogenTM (Life Technologies Corp., Carlsbad, California). Todas as frações microssomais foram armazenadas a -80°C .

Metanol, acetonitrila, acetato de etila e etanol grau HPLC foram obtidos da Mallinckrodt Baker (St. Louis, MO, EUA).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida através de um sistema Milli-Q (Millipore).

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo modelo AL204, com precisão de $\pm 0,0001$ g.

As soluções salinas preparadas foram filtradas a vácuo em um sistema Millipore, utilizando membranas de nylon Phenomenex de 0,45 µm.

As medidas de pH foram realizadas em um pH-metro Logen, com precisão ± 0,01 unidades de pH.

As fases móveis preparadas foram degaseificados em um ultrassom COLE-PARMER modelo 8852

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram da marca Eppendorf, e a homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex Phonex modelo AP56.

As incubações foram realizadas em um banho-maria com agitação Nova Ética, modelo Dubnoff 304-DE.

No preparo de amostras foram utilizadas uma centrífuga da Eppendorf, modelo 5415R e uma Speed Vaccum da Thermo Scientific, modelo savant SPD 131DDA-15.

2.2.2. Obtenção das frações microssomais

As frações microssomais de fígado de rato preparadas em laboratório foram obtidas a partir de fígados de ratos Wistar utilizando o procedimento de extração por centrifugação diferenciada, descrito por BELAZ e OLIVEIRA (2013).¹³¹

2.2.2.1. Preparo da solução tampão fosfato salino (PBS)

Para preparar a solução tampão PBS, pesou-se 1,36 g do sal KH_2PO_4 (10 mmol/L), 1,74 g do sal K_2HPO_4 (10 mmol/L), 85,6 g de sacarose (250 mmol/L) e dissolveu-se em 1,0 L de água destilada. Por fim, adicionou-se 400 µL da solução de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) (0,134 mmol/L), a qual foi preparada dissolvendo-se 23,3 mg de PMSF em 400 µL de etanol (334,4 mmol/L). O que resulta em um pH final de 7,4.

2.2.2.2. Extração das frações microssomais

Para extração das frações microssomais, foram utilizados fígados de ratos Wistar, de 6-8 semanas e 400 g em média. Os fígados armazenados à -80°C, foram

degelados e pesados em tubos do tipo Falcon (50 mL), sobre os quais foi adicionado 5 mL da solução tampão PBS (pH 7,4) para cada grama de fígado. Posteriormente, os fígados foram triturados com auxílio de uma tesoura e homogeneizados com uso do homogeneizador mecânico (Turrax). O homogenato foi submetido a uma sequência de centrifugações, para eliminação dos fragmentos celulares, mitocondriais, nucleares e por fim, obtenção das frações microssomais. Vale ressaltar que todos os procedimentos foram realizados em banho de gelo, de forma a manter a atividade enzimática.

As etapas de centrifugação foram realizadas à 4°C. Primeiramente o homogenato foi centrifugado por 5 min na rotação de 500 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 min na rotação de 5400 rpm. Em seguida, o sobrenadante desta etapa foi centrifugado por 20 min na rotação de 10000 rpm. Por fim, realizou-se a etapa de ultracentrifugação a uma rotação de 45000 rpm por 60 min. O sobrenadante desta última etapa foi descartado e os pellets foram dissolvidos com solução tampão PBS (pH 7,4) e homogeneizados com auxílio do equipamento Ultrasonifier. A solução microssomal foi transferida para tubos criogênicos e armazenada à -80°C.

2.2.3. Determinação da concentração proteica das frações microssomais

A determinação da concentração protéica das frações microssomais foi realizada baseando-se no método de Bradford.¹³²

2.2.3.1. Preparo das soluções de albumina sérica bovina (BSA)

Inicialmente preparou-se uma solução padrão de BSA em água na concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, transferiu-se uma alíquota desta solução para uma cubeta de quartzo e realizou-se a leitura em 280 nm e, então, ajustou a concentração da solução para obter absorvância de 0,66.¹³³ A partir da solução padrão, preparou-se em triplicata seis soluções nas concentrações de 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0 e 1000 µg/mL (concentração da solução padrão), pipetando-se alíquotas de 10-80 µL, respectivamente, da solução padrão de BSA para tubos de ensaio com água para um volume final de 100 µL.

2.2.3.2. Preparo do reagente de Bradford

O reagente de Bradford foi preparado baseando-se no procedimento descrito por BRADFORD (1976).¹³² Preparou-se uma solução do corante azul brilhante, *Coomassie Brilliant Blue*, na concentração de 100 mg/mL. Para tal, dissolveu-se 50,0 mg do corante azul brilhante em 25 mL de etanol. Em seguida adicionou-se 50 mL de ácido fosfórico (85% P.A.), sob constante agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água, obtendo uma solução do corante azul brilhante com concentração final de 100 mg/mL. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

2.2.3.3. Determinação da concentração proteica das frações microssomais por medidas espectrofotométricas das amostras

Adicionou-se 5,0 mL da solução do reagente de Bradford à solução de BSA (100 µL) previamente preparada, agitou-se com auxílio de um vortex por 5 s e deixou-se reagir, em repouso, por 7 minutos. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se a absorbância no comprimento de onda 595 nm. As absorbâncias foram medidas contra um branco de corante.

Repetiu-se o mesmo procedimento, em triplicata, para todas as amostras padrão, bem como para as amostras de concentração desconhecida (fração microssomal). As amostras de concentração desconhecidas foram submetidas a uma diluição prévia para que pudessem ser quantificadas na curva de calibração preparada, de modo geral, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um balão de 5,0 mL, completando-se o volume com água.

2.2.4. Condições analíticas para a determinação do LPSF-PT31 por LC-MS

O desenvolvimento e otimização das condições analíticas para análise do LPSF-PT-31 por LC-MS foi realizado em um sistema cromatográfico (Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com um módulo de comunicação modelo CBM-20A, auto-injetor modelo SIL-20A, degaseificador modelo DGU-20A5 e duas bombas modelo LC-20AD; acoplado a um espectrômetro de massa modelo Esquire 6000 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) provido de um analisador de massa *ion trap* (3D IT) e

uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando no modo positivo. Os parâmetros do MS foram otimizados através da inserção direta da solução de LPSF-PT-31, na concentração de 1,0 µg/mL em MeOH/H₂O (50:50), com o auxílio de uma bomba seringa (10 µL/min) e as condições de análise foram definidas pelo monitoramento da intensidade máxima do íon referente à molécula protonada. Os parâmetros para o gás nebulizador, temperatura e vazão do gás de secagem foram ajustados manualmente. Já os parâmetros do potencial do capilar, *skimmer* e octopolo, dentre outros foram ajustados automaticamente, utilizando o software Esquire 6000. Os parâmetros otimizados para o MS foram: voltagem no capilar 4,5 kV; voltagem no *skimmer* 33,3 V; amplitude de fragmentação 0,30 V; pressão do gás de nebulização (N₂) 30 psi; vazão do gás de secagem (N₂) 7,0 L/min e temperatura da fonte de ionização 325 °C.

Para a aquisição dos dados o 3D IT foi operado no modo *full MS scan* utilizando um tempo máximo de acúmulo de íons de 100 ms, um *target* (quantidade de íons acumulados no *ion trap*) de 30.000 e uma faixa de aquisição de *m/z* 100 a 400. A aquisição e processamento dos dados foram realizados utilizando o software *Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A separação cromatográfica foi obtida empregando uma coluna Phenomenex Luna fenil-hexil (150 x 2,0 mm; 5 µm;) e uma pré-coluna fenil-hexil (4,0 x 3,0 mm) à temperatura ambiente (± 20°C). Inicialmente, foi utilizado uma fase móvel constituída de MeOH/ solução tampão acetato de amônio (5 mM; pH 5,5) (60:40,v/v), volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,2 mL/min; com intuito de monitorar o decaimento do LPSF-PT-31 e otimizar as condições de incubação através do planejamento experimental. A vazão de fase móvel para o MS foi de aproximadamente 95 µL/min, onde se utilizou um divisor de vazão (T).

Adicionalmente, foi desenvolvida uma condição de análise no modo gradiente de eluição para separação do LPSF-PT-31 e dos seus possíveis metabólitos, onde utilizou-se MeOH e solução tampão acetato de amônio (5,0 mmol/L; pH 5,5) a uma vazão de 0,4 mL/min, mantendo a vazão no MS de 95 µL/min, com as seguintes condições de eluição gradiente: 0-1min (5% MeOH); 1-2 min (5-40% MeOH); 2-13,5 min (40-60% MeOH); 13,5-14 min (60-95% MeOH); 14-15 min (95-5% MeOH); 15-18 min (5% MeOH).

2.2.5. Otimização das condições de incubação

2.2.5.1. Preparo da solução tampão fosfato de potássio monobásico

Para preparar a solução tampão fosfato de potássio monobásico, pesou-se 0,136 g do sal KH_2PO_4 (10 mmol/L) e solubilizou-se em um volume de 100 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 7,4 com uma solução de KOH 3,0 mol/L.

2.2.5.2. Preparo da solução de NADPH

A solução de NADPH (20 mmol/L) foi preparada diariamente, através da pesagem de 33,3 mg de NADPH e diluição com água para um volume total de 2,0 mL.

2.2.5.3. Preparo do sistema gerador de NADPH

Para preparar o sistema gerador de NADPH misturou-se 100 μL de cada uma das seguintes soluções: NADP^+ (32,5 mmol/L), glicose-6-fosfato (82,5 mmol/L) e MgCl_2 (82,5 mmol/L) e completou-se o volume com água para obter um volume total de 1000 μL . Imediatamente, antes de iniciar os ensaios de incubação, foi adicionado a essa mistura 1,0 μL da solução de glicose 6-fosfato desidrogenase (4,0 U/mL). Para preparar volumes maiores do sistema gerador de NADPH, os volumes das soluções foram utilizados proporcionalmente. O sistema gerador de NADPH foi preparado antes da realização de cada ensaio. As soluções estoque de NADP^+ , glicose-6-fosfato e MgCl_2 foram preparadas em água e armazenadas a -20°C por até 30 dias. Já a solução de glicose-6-fosfato desidrogenase foi adquirida em solução de sulfato de amônio (3,2 mol/L; pH 7,0).

2.2.5.4. Condições iniciais do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31

Inicialmente, os experimentos de metabolismo *in vitro* foram realizados em um *ependorf* de 2,0 mL, onde adicionou-se 422 μL de solução tampão fosfato de potássio monobásico (10 mmol/L, pH 7,4), 50 μL de fração microsomal (2,0 mg/mL) e 3,0 μL da solução de LPSF-PT-31 em metanol (16 $\mu\text{mol/L}$); com o percentual de

solvente orgânico na mistura reacional menor que 1% (v/v). Após pré-incubação da mistura por 5 min, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL do cofator NADPH (1,0 mmol/L), com volume final de incubação de 500 µL. A reação foi realizada em um banho termostatizado à 37°C sob agitação constante. Após o tempo de incubação desejado, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de acetonitrila, levando a precipitação proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm. Uma alíquota da amostra foi retirada e analisada por LC-MS.

Também foram realizados experimentos controles (na ausência de NADPH), a fim de se obter o percentual de biotransformação do LPSF-PT-31 no meio reacional. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O percentual de biotransformação foi calculado comparando as áreas cromatográficas das amostras controles com as amostras de biotransformação, o que corresponde ao decaimento do substrato no meio reacional, ou seja, à conversão do LPSF-PT-31 a metabólito.

2.2.5.5. Planejamento fatorial 2⁴

Realizou-se um planejamento experimental 2⁴ onde a concentração e a composição da solução tampão utilizada nos ensaios de biotransformação foram fixadas e verificou-se a influência das seguintes variáveis: concentração do LPSF-PT-31, concentração proteica, concentração de NADPH e tempo de incubação. Cada variável foi avaliada em dois níveis, sendo um nível inferior e um nível superior como descrito na Tabela 2.1.

TABELA 2.1- Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial 2⁴

Variáveis	Nível Inferior (-1)	Nível Superior (1)
[LPSF-PT-31]	4,0 µmol/L	20 µmol/L
[Proteica]	1,0 mg/mL	10 mg/mL
[NADPH]	2,0 mmol/L	10 mmol/L
Tempo de Incubação	60 min	120 min

Foram realizados 16 experimentos de biotransformação, com as possíveis combinações dos níveis escolhidos das variáveis estudadas, conforme descrito na Tabela 2.2. Os experimentos foram realizados de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.5.4.

Adicionalmente, uma concentração maior do LPSF-PT-31 foi avaliada (100 $\mu\text{mol/L}$), para verificar a possibilidade do aumento da formação de metabólito. Também foi avaliado o uso de sistema gerador de NADPH como uma alternativa menos dispendiosa para produzir NADPH *in situ*.

TABELA 2.2 - Matriz de planejamento dos experimentos para o planejamento fatorial 2^4

Experimentos	[LPSF-PT-31]	[Proteica]	[NADPH]	Tempo
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1

2.2.6. Condições otimizadas do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31

Após a otimização das condições de incubação, os experimentos de metabolismo *in vitro* foram realizados utilizando RLMs e HLMs. Em um eppendorf de 2,0 mL, adicionou-se 247 μL de solução tampão fosfato de potássio monobásico (10 mmol/L; pH 7,4), 50 μL de fração microsomal (1,0 mg/mL) e 3,0 μL solução de LPSF-PT-31 em metanol (100 $\mu\text{mol/L}$); com o percentual de solvente orgânico na mistura reacional menor que 1% (v/v). A mistura reacional foi pré-incubada por 5 min e, em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 200 μL do sistema gerador de NADPH contendo NADP^+ (1,3 mmol/L), glicose 6-fosfato (3,3 mmol/L), MgCl_2 (3,3 mmol/L) e glicose 6-fosfato desidrogenase (0,4 U/ μL); com volume final de incubação de 500 μL . A reação foi realizada em um banho termostatizado à 37°C sob agitação constante. Após 60 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de acetonitrila, levando a precipitação proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL, diluído com 500 μL de água e submetido

à extração líquido-líquido com acetato de etila (5,0 mL). A fração orgânica foi removida e evaporada até à secura utilizando em um sistema concentrador de amostras. O resíduo foi reconstituído com 100 µL de solução tampão acetato de amônio/metanol (1:1, v/v) e 10 µL foram injetados no sistema de LC-MS.

Também foram realizados experimentos controles, incluindo: a) incubação na ausência do sistema gerador de NADPH; b) na ausência de LPSF-PT-31; c) na ausência de fração microsomal e, d) tempo zero min de incubação; onde os volumes foram compensados com solução tampão nos controles a, b e c. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. O percentual de biotransformação foi calculado comparando a área cromatográfica do LPSF-PT-31 na amostra de biotransformação com a área cromatográfica do LPSF-PT-31 no controle de tempo zero min de incubação.

2.2.7. Condições de metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 em larga escala: isolamento do metabólito do LPSF-PT-31

Incubações em larga escala foram realizadas a fim de obter quantidade suficiente do metabólito observado para o LPSF-PT-31 para adicional caracterização estrutural utilizando análises por RMN. Assim, os experimentos de metabolismo *in vitro* foram realizados em um tubo Falcon de 15 mL, onde adicionou-se 1482 µL de solução tampão fosfato de potássio monobásico (10 mmol/L; pH 7,4), 300 µL solução de RLMS (2,0 mg/mL) e 18 µL solução de LPSF-PT-31 em metanol (20 µmol/L); com o percentual de solvente orgânico na mistura reacional menor que 1% (v/v). Após uma pré-incubação de 5 min, a reação foi iniciada pela adição de 1200 µL do sistema gerador de NADPH, com volume final de incubação de 3000 µL. A reação foi realizada em um banho termostatizado à 37°C sob agitação constante. Após 120 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 3000 µL de acetonitrila, levando a precipitação proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL e submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila (5,0 mL). A fração orgânica foi removida e evaporada até à secura utilizando em um sistema concentrador de amostras. O resíduo foi reconstituído com 100 µL de solução tampão acetato de amônio/metanol (1:1, v/v) e 10 µL foram injetados no

sistema de LC-MS. Também foram realizados experimentos controles na ausência de NADPH. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Para obtenção em quantidades multimiligramas do metabólito, o eluente do LC correspondente à banda cromatográfica do metabólito (ion m/z 259) foi coletada manualmente. A fase móvel foi evaporada até à secura utilizando em um sistema concentrador de amostras. O resíduo foi reconstituído em acetonitrila deuterada para ser analisado por RMN.

2.2.8. Condições experimentais para análise por RMN

Os experimentos por RMN foram realizados em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (*Ultrashield Plus®*). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse*) de 5 mm, com bobinas de ^1H e ^{13}C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77 K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53 G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (*Automatic Tunning e Matching*).

Amostras de LPSF-PT-31 e do metabólito do LPSF-PT-31 isolado foram dissolvidas em 200 μL de acetonitrila deuterada em tubos de RMN (Bruker, 3 mm de diâmetro externo), à 25°C. Os dados de RMN ^1H foram adquiridos com uma sequência de pulsos com dupla pré-saturação do sinal do solvente para a supressão dos sinais de água e acetonitrila. Para tanto o pulso de pré-saturação foi aplicado durante o período de 2,40 s, que foi o período de espera entre as aquisições. Os espectros foram adquiridos utilizando 64.000 pontos em uma janela espectral de 12.019,23 Hz, resultando em um tempo de aquisição de 2,73 s. Os espectros foram adquiridos com a leitura de 256 varreduras para obter uma relação sinal/ruído satisfatória. Os dados foram processados utilizando multiplicação exponencial aplicando um fator de alargamento de linha (lb) de 0,3 Hz. Os dados foram adquiridos e processados utilizando o software TOPSPIN 3.0 (Bruker BioSpin).

2.3. Resultados e Discussão

O metabolismo ou biotransformação é o principal mecanismo de eliminação de xenobióticos do corpo humano, incluindo os fármacos, através da conversão da molécula alvo em metabólitos. Portanto, o estudo da rota metabólica e da identificação dos metabólitos provenientes da biotransformação de uma nova entidade química (NCE - *New Chemical Entity*) desempenha um papel importante e essencial nas fases iniciais do processo de desenvolvimento e descobrimento de novos fármacos;⁶ pois os metabólitos podem ter um impacto significativo sobre a biodisponibilidade e eficácia de um fármaco ou NCE.¹¹ Adicionalmente, a identificação de metabólitos é um pré-requisito para o estabelecimento de procedimentos analíticos para investigar o perfil farmacocinético. Considerando que os metabólitos formados durante o processo de biotransformação podem ter efeitos farmacológicos e toxicológicos, os ensaios realizados neste trabalho têm como objetivo estudar o metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 a fim de identificar e caracterizar estruturalmente os seus produtos de biotransformação.

2.3.1. Determinação da concentração proteica das frações microsossomais

Para determinação da concentração proteica das frações microsossomais foi utilizado o método de Bradford. Através de análises por espectrofotometria no UV-vis, conforme descrito no item 2.2.3.3 determinou-se a concentração proteica por meio da interpolação do valor de absorbância para amostra de microsossoma na curva de calibração obtida com BSA. A precisão das replicatas (n=3) de BSA apresentou coeficientes de variação entre 1,11 e 2,66%. Os valores de exatidão entre 97,7 e 103%. Portanto, todos estes valores foram considerados aceitáveis, pois apresentaram variabilidades menores que 15%. Deste modo, obteve-se uma concentração proteica da fração microsossomal de 63,5 mg/mL. A Figura 2.2 ilustra a curva de calibração obtida com BSA e a Tabela 2.3 lista os valores de precisão e exatidão das réplicas realizadas.

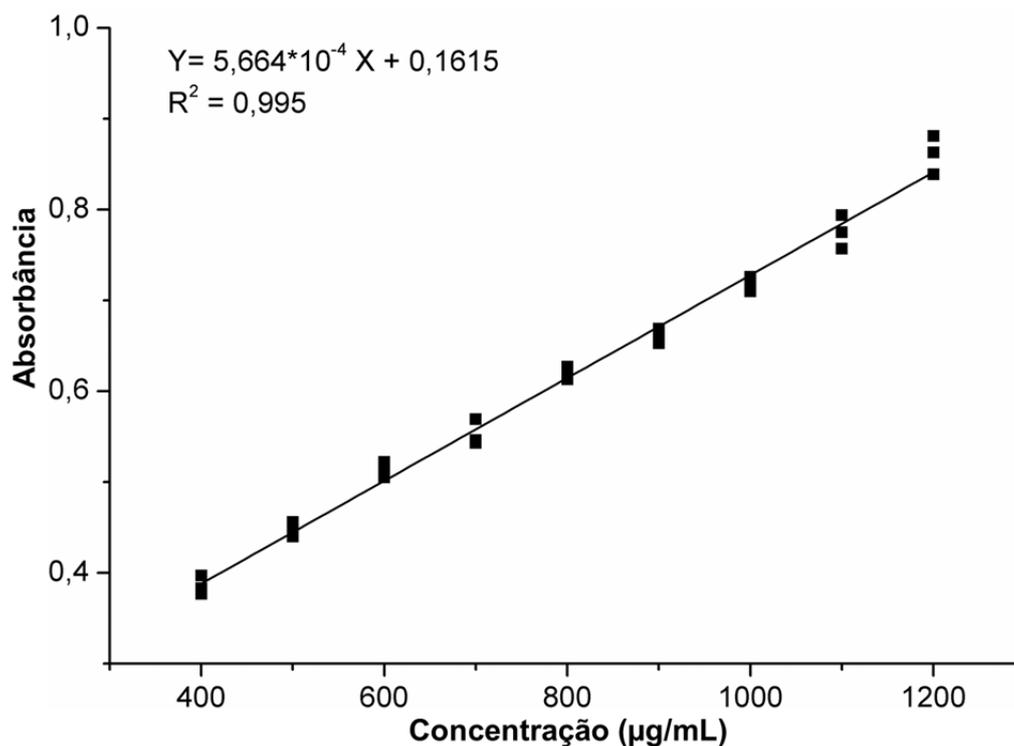


FIGURA 2.2 - Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA para a determinação da concentração proteica da fração microsomal de fígados de rato.

TABELA 2.3 - Exatidão (%) e precisão (%) obtidas para as diferentes concentrações da curva de calibração para BSA (n=3)

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
400	2,66	99,0
500	1,82	101
600	1,71	103
700	2,57	98,7
800	1,26	101
900	1,29	97,7
1000	1,11	98,3
1100	2,39	98,5
1200	2,45	103

2.3.2. Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas

Tecnicamente, a identificação de produtos de biotransformação (metabólitos) envolve três etapas: separação, detecção e análise estrutural.¹³⁴ Neste trabalho, inicialmente, conduziu-se o desenvolvimento do método analítico onde duas colunas

cromatográficas foram avaliadas para otimizar a separação analítica do LPSF-PT-31 e de seus possíveis metabólitos: uma coluna C18 nucleosil (150 x 4,6 mm i.d.; 5 µm,) e uma coluna Luna fenil-hexil (150 x 2,1 mm i.d.; 5 µm, Phenomenex). Estas colunas analíticas foram avaliadas em diferentes composições de fase móvel, utilizando diferentes proporções de metanol ou acetonitrila como modificador orgânico e água acidificada com ácido fórmico ou solução tampão acetato de amônio (5,0 mmol/L) em diferentes valores de pH, como fase aquosa.

A coluna C18 mostrou baixa capacidade de retenção ($k < 2$) do LPSF-PT-31 em todas as condições analíticas empregadas, enquanto a coluna fenil-hexil, apesar de mostrar uma banda cromatográfica de 2 min, ainda assim, forneceu simetria da banda (~1,75 a 10% da altura da banda) e fator de retenção satisfatórios ($k > 2$), sendo esta selecionada para realizar os estudos posteriores de metabolismo *in vitro*.

Nas análises das amostras provenientes da biotransformação do LPSF-PT-31, a coluna fenil-hexil também forneceu satisfatória separação do LPSF-PT-31, do metabólito do LPSF-PT-31 e de outros compostos interferentes provenientes da matriz biológica. A melhor condição para a análise cromatográfica foi alcançada fazendo-se uso de metanol e solução tampão acetato de amônio (5,0 mmol/L, pH 5,5). As condições cromatográficas otimizadas estão descritas no item 2.2.4. A Figura 2.3a ilustra o perfil cromatográfico obtido por LC-MS para o LPSF-PT-31 e a Figura 2.3b ilustra seu respectivo espectro de massas referente à banda cromatográfica em 5,8 minutos. O composto foi detectado através do íon m/z 243, referente à protonação do LPSF-PT-31 no modo positivo de ionização.

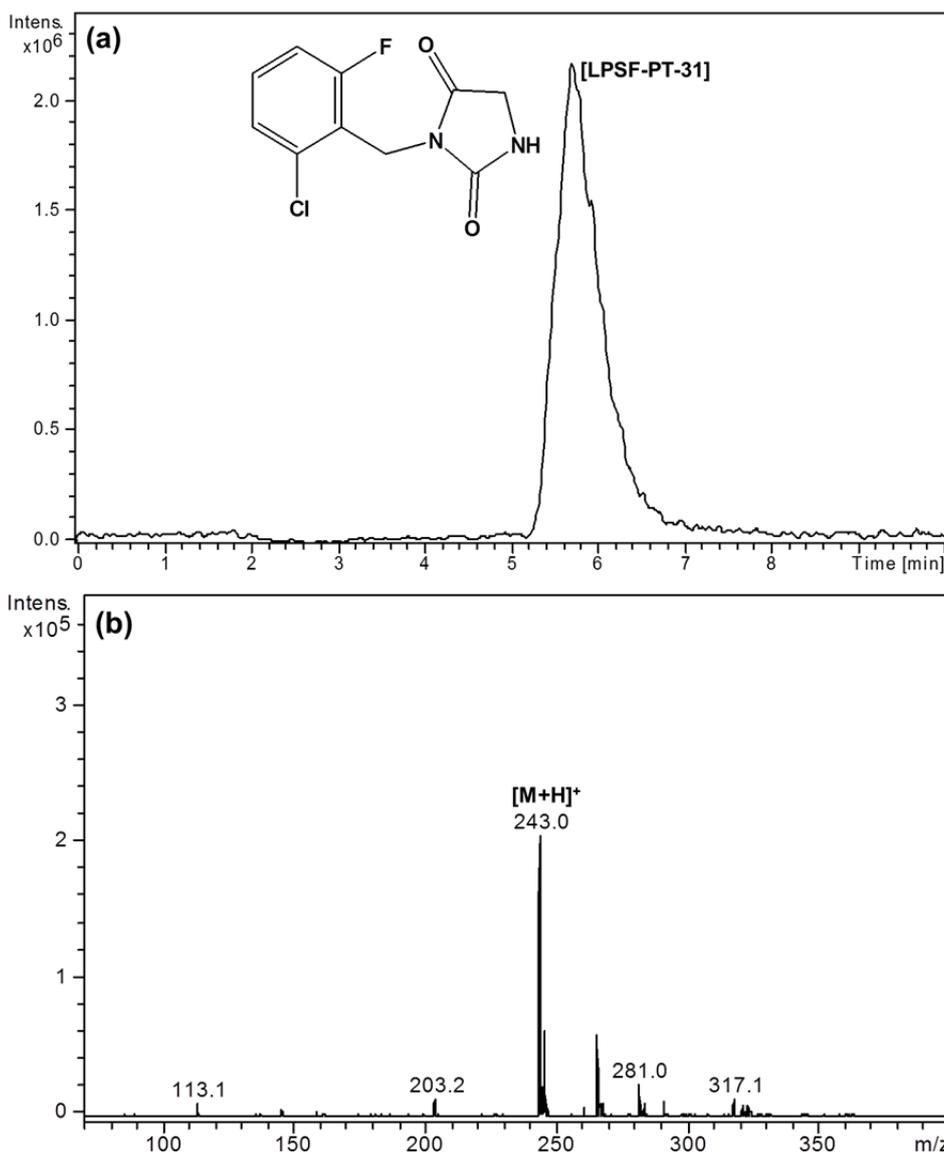


FIGURA 2.3 – Análises por LC-MS. (a) Cromatograma de íon extraído (EIC) relativo ao LPSF-PT31 (m/z 243) em fração microsossomal na concentração de 16 $\mu\text{mol/L}$. (b) Espectro de massas referente à banda cromatográfica do LPSF-PT31, onde a molécula protonada apresenta m/z 243. Coluna Phenomenex Luna fenil-hexil (5 μm ; 150 x 2,0 mm); fase móvel: metanol/tampão acetato de amônio (5 mM; pH 5,5) (60:40,v/v); vazão: 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 μL .

2.3.3. Planejamento fatorial 2^4

Utilizando o método de LC-MS desenvolvido no modo de eluição isocrático e as condições iniciais de biotransformação *in vitro*, foi observado um decaimento de 32,0% da área da banda cromatográfica do LPSF-PT-31, referente ao processo de biotransformação.

Com intuito de obter uma condição de incubação que resultasse em uma alta capacidade de biotransformação e, conseqüentemente, maior formação de metabólitos, foi realizado um planejamento experimental 2^4 . O planejamento consistiu em um planejamento fatorial de dois níveis com quatro variáveis de interesse (2^4), onde cada variável de interesse foi analisada em um nível superior e um nível inferior. Para tal, foram realizados experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis das variáveis.

O planejamento fatorial de dois níveis é muito útil em investigações preliminares, quando o objetivo é saber se determinadas variáveis tem ou não influencia sobre a resposta desejada, que no presente caso é o percentual de biotransformação *in vitro* do LPSF-PT-31. As principais vantagens do emprego de planejamento fatorial em relação à realização de experimentos de modo univariado é a possibilidade de se alterar mais de uma variável ao mesmo tempo, o que resulta na redução do número de experimentos e, conseqüentemente, na redução do tempo e custo experimental. Adicionalmente, a realização de um planejamento experimental possibilita avaliar a interação entre as variáveis de estudo, ou seja, podemos avaliar quando o efeito de uma variável depende do nível de outra.¹³⁵ Com a realização dos experimentos direcionados pelo planejamento fatorial 2^4 foi possível avaliar a influência da concentração proteica, concentração de LPSF-PT-31, concentração de NADPH e do tempo de incubação no percentual de biotransformação do LPSF-PT-31. A Tabela 2.4 ilustra alguns resultados relevantes do planejamento experimental.

TABELA 2.4 - Resultados relevantes do planejamento experimental

Experimentos	[LPSF-PT-31]	[Proteica]	[NADPH]	Tempo	Biotransformação (%)
1	-1	-1	-1	-1	6,50
12	1	1	-1	1	31,2
15	-1	1	1	1	54,8
16	1	1	1	1	54,7

Pode-se observar que no experimento 1, onde todas as variáveis foram mantidas no nível inferior, o percentual de biotransformação foi de apenas 6,5%. O que pode ser visto na Figura 2.4a. Já nas condições empregadas no experimento 12, onde apenas a concentração de NADPH foi mantida no nível inferior, foi

observado um percentual de biotransformação de 31,2%. No entanto, quando todas as variáveis são mantidas no nível superior (experimento 16), a biotransformação foi de 54,7%. Esses resultados estão ilustrados nos cromatogramas da Figura 2.4b.

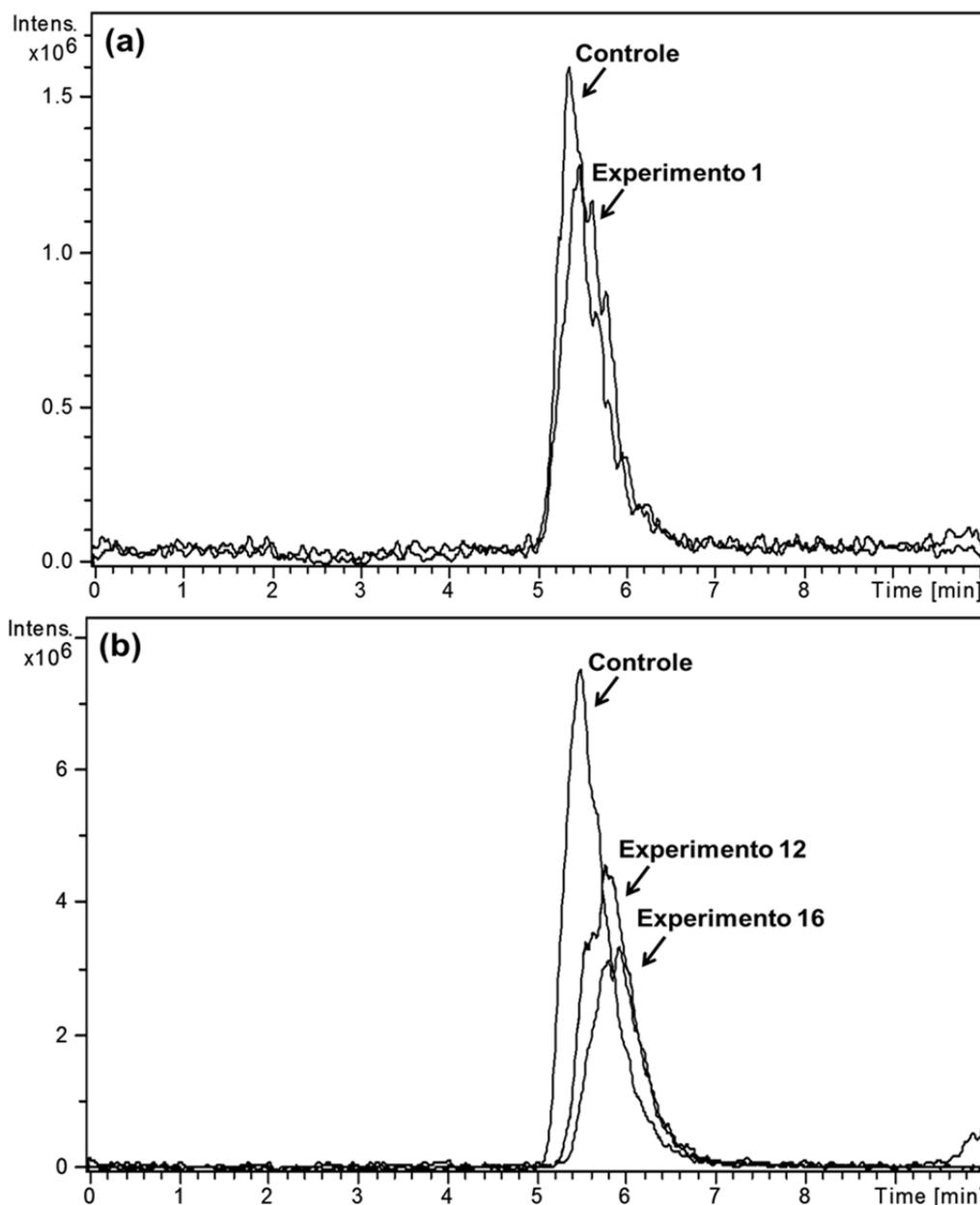


FIGURA 2.4 - Cromatograma de íon extraído (EIC) do m/z 243, relativo aos experimentos de planejamento experimental LPSF-PT31. (a) Controle (ausência de NADPH) e experimento 1; (b) Controle (ausência de NADPH), experimento 12 e experimento 16.

Assim, como observado, a concentração de NADPH influencia diretamente a biotransformação do composto e as enzimas responsáveis por esse processo são dependentes do cofator NADPH. Com o experimento 15, onde apenas a

concentração de LPSF-PT-31 foi mantida no nível inferior, foi observado uma biotransformação de 54,8% (Tabela 2.4), o que indica que a concentração de LPSF-PT-31 na faixa avaliada não altera o percentual de biotransformação.

A Tabela 2.5 ilustra os efeitos e os principais contrastes calculados utilizando ferramentas estatísticas, onde se pode notar que para a obtenção de um maior percentual de biotransformação do LPSF-PT-31 as variáveis concentração proteica, concentração de NADPH e tempo são as variáveis que mais influenciaram no metabolismo *in vitro*. Ainda, essa resposta tem um fator positivo, ou seja, para se aumentar o percentual de biotransformação é necessário manter estas variáveis no nível superior.

TABELA 2.5 - Principais efeitos e interações entre as variáveis

Variáveis	Efeito	Conclusões
[LPSF-PT-31]	-2	Indiferente
[Proteica]	31	Aumentar (fixar em +1)
[NADPH]	9	Aumentar (fixar em +1)
Tempo	8	Aumentar (fixar em +1)
Interações	Efeito de interações	
[LPSF-PT-31] / [Proteica]	4	
[LPSF-PT-31] / Tempo	4	
[Proteica] / [NADPH]	14	

Da mesma forma, observou-se que a interação mais relevante foi entre a concentração proteica e a concentração de NADPH, sendo esta também positiva, o que indica que a concentração proteica e a concentração de NADPH devem sempre estar no mesmo nível e, portanto no nível superior.

Experimentos adicionais utilizando alta concentração de LPSF-PT-31 (100 µmol/L) foram realizados com o intuito de aumentar a formação do metabólito. O uso do sistema gerador de NADPH também foi avaliado para a produção de NADPH *in situ* como uma alternativa menos dispendiosa, o qual demonstrou eficácia e um percentual de biotransformação de cerca de 59,0%. Vale ressaltar que o planejamento experimental proporcionou uma ampla visão do sistema de incubação, no entanto não foi possível realizar todo o estudo de metabolismo nas condições do

experimento 16, com todas as variáveis no nível superior, devido ao alto custo da fração microssomal e do NADPH. Assim, as condições finais de incubação do LPSF-PT-31 fizeram uso de alta concentração do LPSF-PT-31 (100 µmol/L), do sistema gerador de NADPH e concentração proteica de 1,0 mg/mL, como descrito no item 2.2.6.

2.3.4. Metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 e identificação do metabólito formado por LC-MSⁿ

Os metabólitos produzidos por incubação *in vitro* são geralmente identificados por análises em *full MS scan*, através da comparação dos cromatogramas de íon total e espectros das amostras controle e de biotransformação. Assim, os íons com específica razão massa/carga (m/z) e correspondente bandas cromatográficas que estão presentes na amostra de biotransformação e ausentes na amostra controle foram considerados como possíveis metabólitos.⁶

O método de análise por LC-MS no modo de eluição gradiente (descrito no item 2.2.4) e as condições otimizadas de biotransformação *in vitro* foram utilizadas para identificar os possíveis metabólitos provenientes do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31. Os cromatogramas de íons totais provenientes do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 (20 µmol/L) utilizando RLMs estão ilustrados na Figura 2.5. O LPSF-PT-31 eluiu em 10 min e apresentou na sua forma protonada $[M+H]^+$ m/z 243. Comparando os cromatogramas de *full MS scan* das amostras controles e da amostra de biotransformação do LPSF-PT-31 (Figura 2.5) foi observado em ambos cromatogramas a presença de um interferente em aproximadamente 7,8 min, o qual não foi previamente encontrado na amostra padrão do LPSF-PT-31. Como a amostra controle corresponde à ausência do NADPH, assumiu-se que o interferente é proveniente da fração microssomal. Também foi observada a presença de uma banda cromatográfica na amostra de biotransformação, eluindo em 9 min (Figura 2.5), a qual corresponde a um possível metabólito, pois não está presente no cromatograma da amostra controle. O possível metabólito detectado foi denominado M1 e apresentou na sua forma protonada $[M+H]^+$ m/z 259 (Figura 2.5b) indicando uma aumento de 16 Da na molécula de LPSF-PT-31, sugerindo que M1 seja um metabólito proveniente de uma hidroxilação.

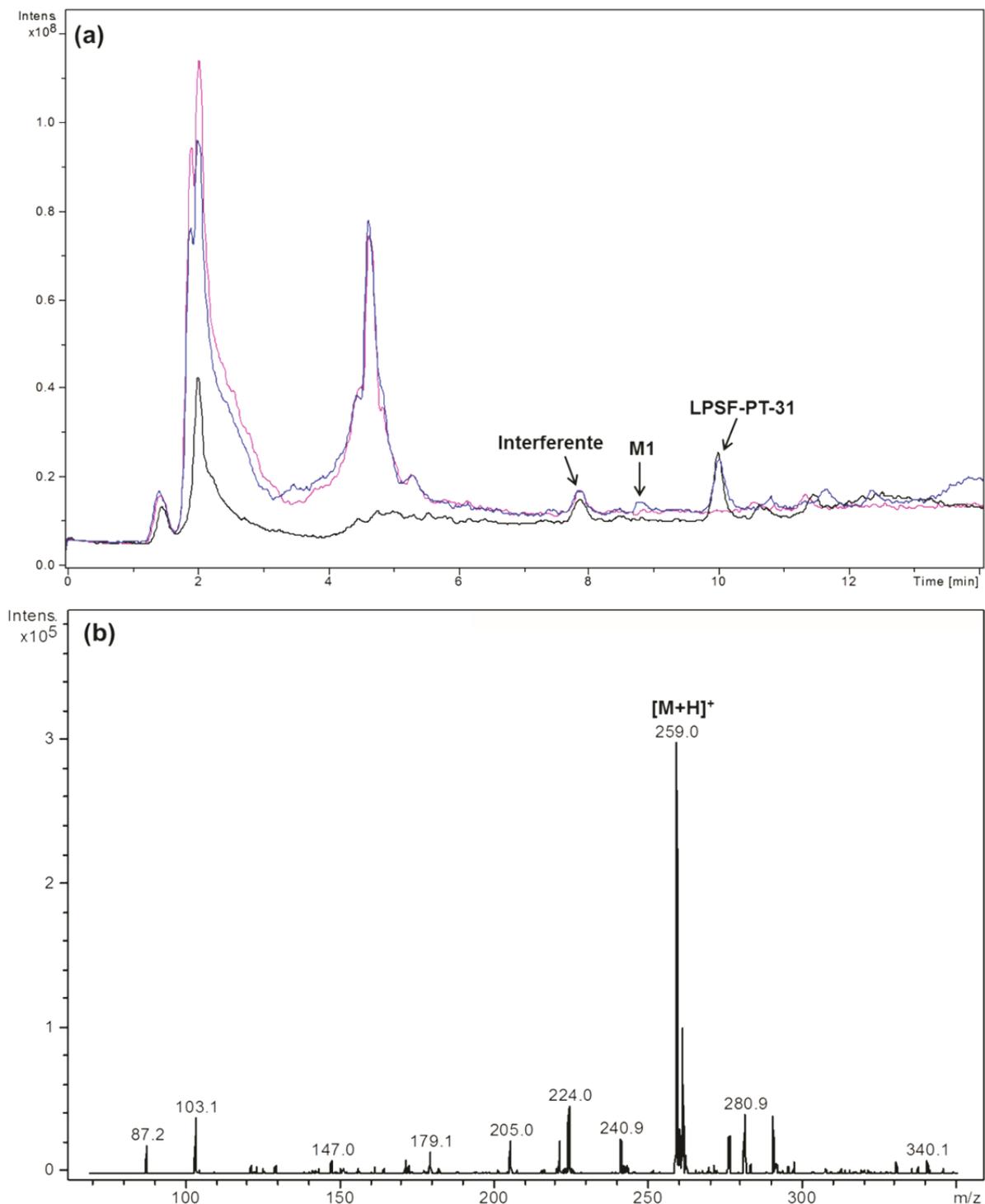


FIGURA 2.5 - (a) Cromatograma de íons totais sobrepostos: amostra controle na ausência de NADPH (preto), amostra controle na ausência de LPSF-PT-31 (rosa) e amostra de biotransformação do LPSF-PT-31 (azul). (b) Espectro de massa do M1. LPSF-PT-31 (20 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com RLMs (10 mg/mL) e sistema gerador de NADPH (volume total de 500 μL) a 37°C por 60 min. Aquisição dos dados: *full MS scan* (100 - 400 m/z); tempo de acúmulo de íons no *trap* de 100 ms.

Sabendo que RLMs e HLMs diferem em termos da composição e atividade das isoformas de CYP P450s,¹³⁶ espera-se observar diferentes perfis metabólicos do LPSF-PT-31 após incubação com os dois sistemas enzimáticos (HLMs ou RLMs). Assim, o metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 foi avaliado também em HLMs a fim de investigar a possível formação de novos metabólitos e também avaliar a influência da diferença de espécies no metabolismo do LPSF-PT-31. Além disso, a utilização de HLMs também é muito útil para prever resultados *in vivo* a partir da extrapolação teórica/computacional de dados *in vitro*.^{19,20,31}

Para as análises das amostras de biotransformação utilizando-se HLMs, utilizou-se também o método de análise por LC-MS no modo de eluição gradiente (descrito no item 2.2.4) e as condições de biotransformação *in vitro* otimizadas em RLMs para identificar os possíveis metabólitos provenientes do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 em HLMs. Em paralelo aos experimentos utilizando HLMs também foi realizado simultaneamente experimentos utilizando RLMs como controle e também para obter uma comparação mais precisa, uma vez que todos os estudos prévios utilizando RLMs foram realizados em diferentes períodos do curso de doutorado devido à indisponibilidade dos HLMs.

Comparando as amostras controle e de biotransformação do LPSF-PT-31 utilizando HLMs (Figura 2.6a), a presença de somente um metabólito foi também observada, o qual apresentou o mesmo tempo de retenção e mesma razão massa/carga (m/z 259) (Figura 2.7) observados para o metabólito proveniente da biotransformação do LPSF-PT-31 utilizando RLMs (Figura 2.6b). Estas observações sugerem que o mesmo metabólito foi produzido nas incubações do LPSF-PT-31 em RLMs e HLMs e que este metabólito seja proveniente de uma hidroxilação. Adicionalmente, o mesmo padrão de fragmentação foi observado para o metabólito do LPSF-PT-31 formado a partir da incubação em RLMs (Figura 2.8) e HLMs (Figura 2.9), confirmando que o metabolismo do LPSF-PT-31 resultou em um mesmo metabólito em ambos os sistemas biológicos e, portanto, não foram observados novos metabólitos no metabolismo do LPSF-PT-31 utilizando HLMs nas condições de análise empregadas. O metabólito do LPSF-PT-31 (M1) não foi detectado nas amostras de controle negativo, tanto em RLMs quanto em HLMs. A Figura 2.6 ilustra o cromatograma de íon extraído do m/z 259 em amostras de metabolismo do LPSFPT-31 utilizando HLMs e RLMs e amostras controles.

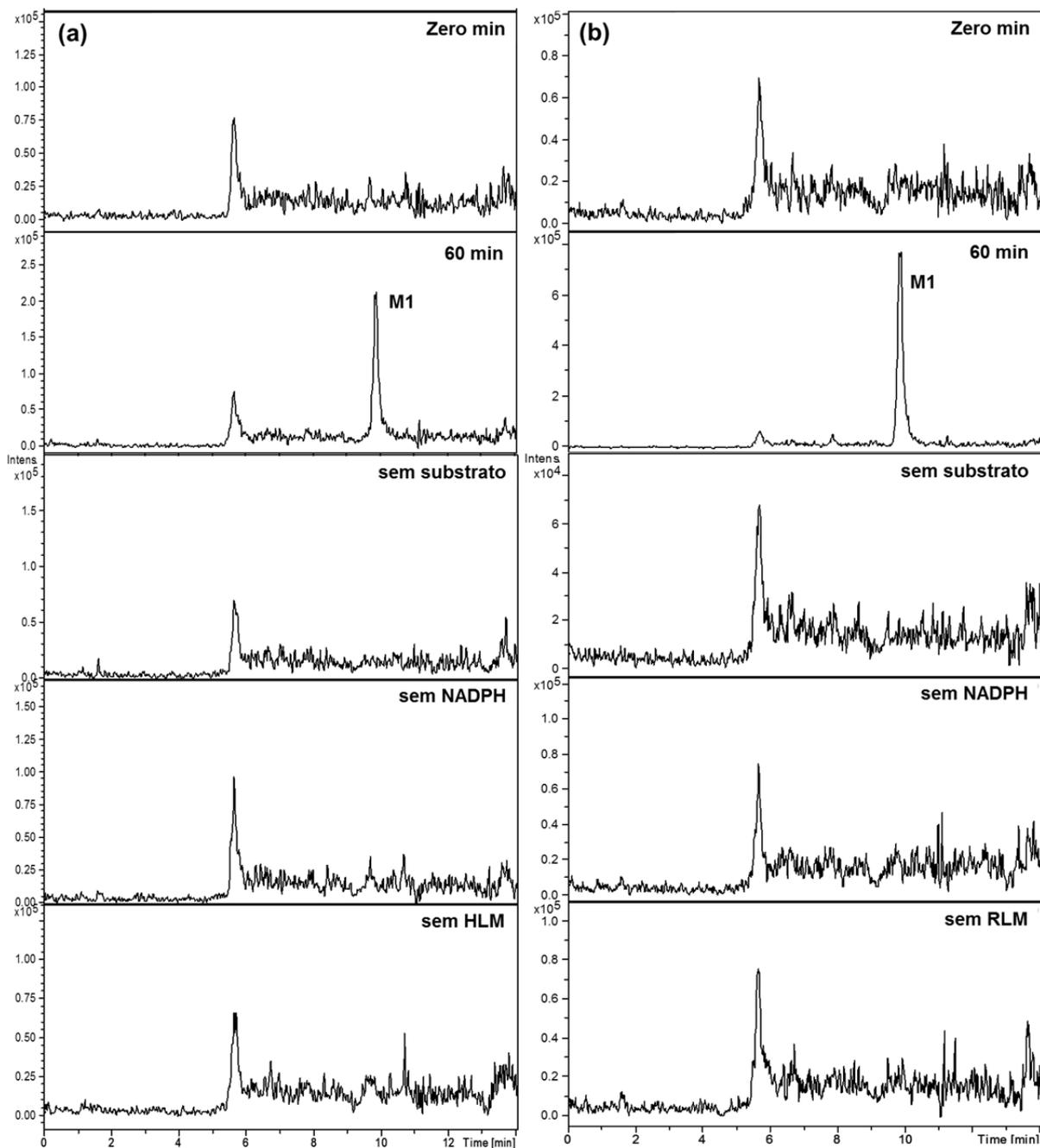


FIGURA 2.6 – Cromatograma de íon extraído do m/z 259 do LPSF-PT-31 em amostras controles e de biotransformação a partir da incubação do LPSF-PT-31 (100 $\mu\text{mol/L}$) com sistema gerador de NADPH (volume final de 500 μL) a 37°C por 60 min. **(a)** em HLMs (1,0 mg/mL) **(b)** em RLMs (1,0 mg/mL). Aquisição dos dados: *full MS scan* (100 - 400 m/z); tempo de acúmulo de íons no *trap* de 100 ms. As amostras controles incluem: amostras em ausência de substrato, ausência de sistema gerador de NADPH, ausência de microsossoma e tempo zero min de incubação; as quais apresentam uma baixa relação sinal-ruído em relação à intensidade do sinal do metabólito.

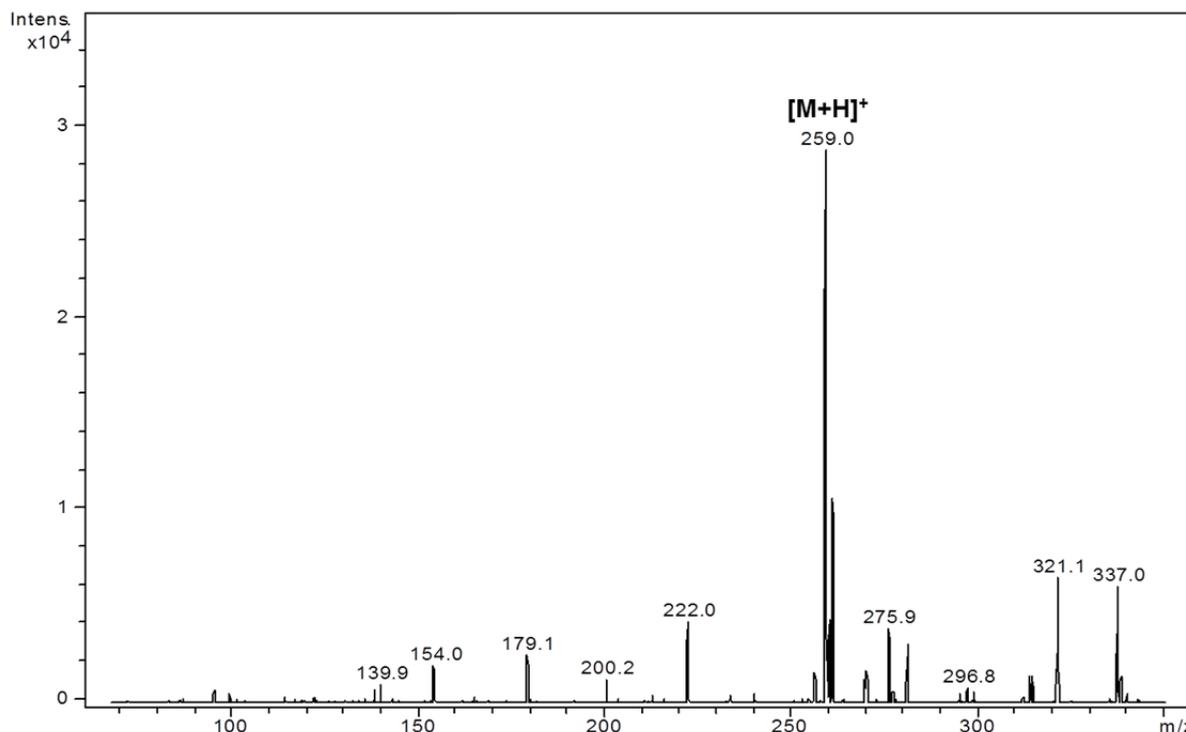


FIGURA 2.7 - Espectro de massa referente à banda cromatográfica do metabólito LPSF-PT-31 proveniente da biotransformação utilizando HLMs. LPSF-PT-31 (100 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com HLMs (1,0 mg/mL) e sistema gerador de NADPH (volume total de 500 μL) a 37°C por 60 min. Aquisição dos dados: full MS scan (70 - 350 m/z); tempo de acúmulo de íons no trap de 100 ms.

No entanto, quando se compara a área da banda cromatográfica do M1 obtido a partir dos ensaios de HLMs e RLMs, observou-se que a formação do M1 em RLMs foi 3,3 vezes maior em comparação com a formação em HLMs, indicando que o *clearance* (eliminação) do LPSFPT-31 em RLMs foi maior do que em HLMs, o que sugere uma maior exposição ao fármaco na espécie humana. No entanto, a menor taxa de metabolismo do LPSF-PT-31 por microsomas de fígado humano pode também ser decorrente de diferentes atividades enzimáticas e concentrações das isoformas de CYP P450s envolvidas no metabolismo de LPSF-PT-31, nas frações microsossomais de fígado de rato e humano.

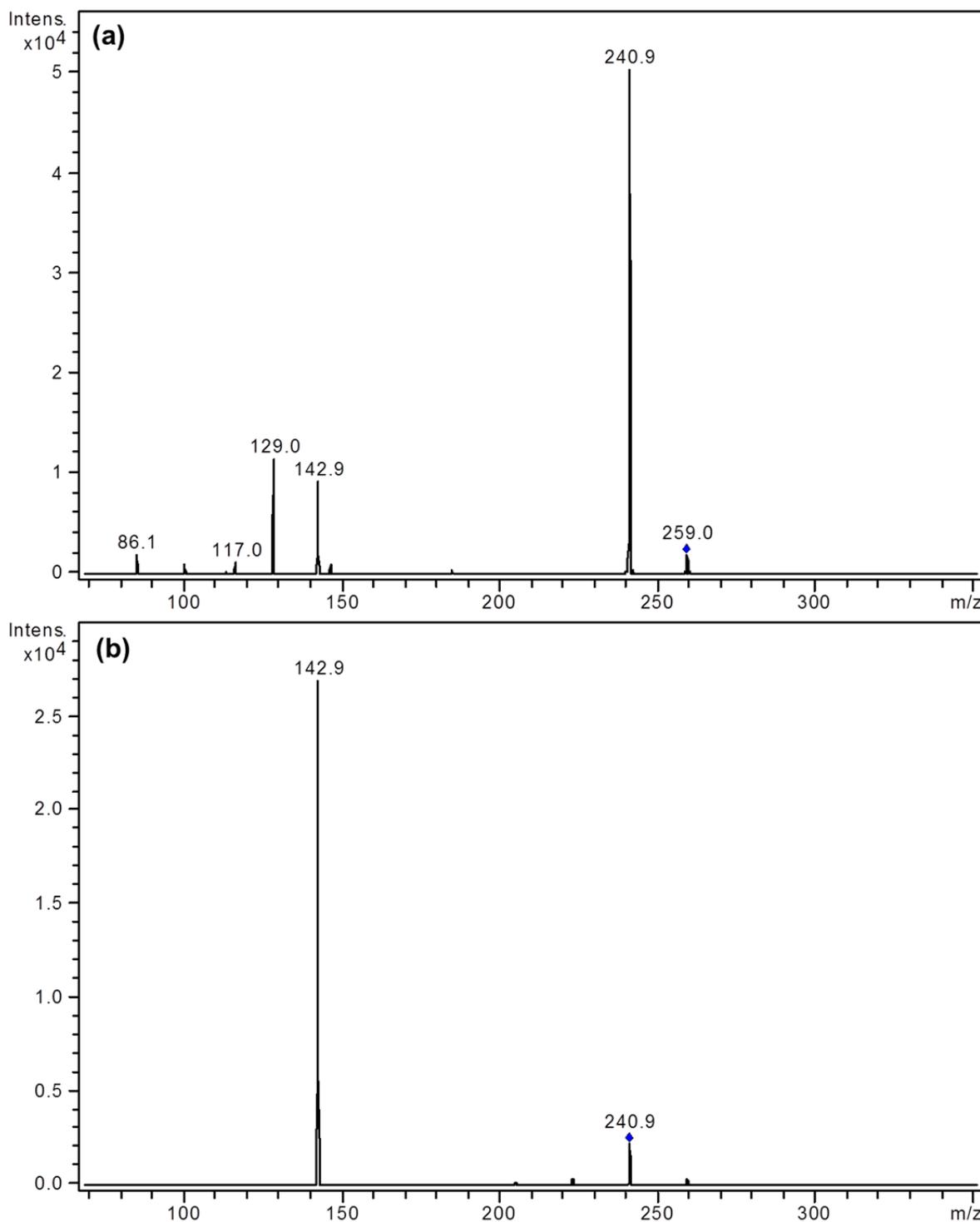


FIGURA 2.8 - Espectro de íons fragmentos do metabólito do LPSF-PT-31 proveniente do metabolismo em RLMs (a) MS² m/z 259, (b) MS³ m/z 241. Aquisição dos dados: *cut off* 65, amplitude de fragmentação de 0,28 V para MS² (m/z 259) e 0,22 V para MS³ (m/z 241).

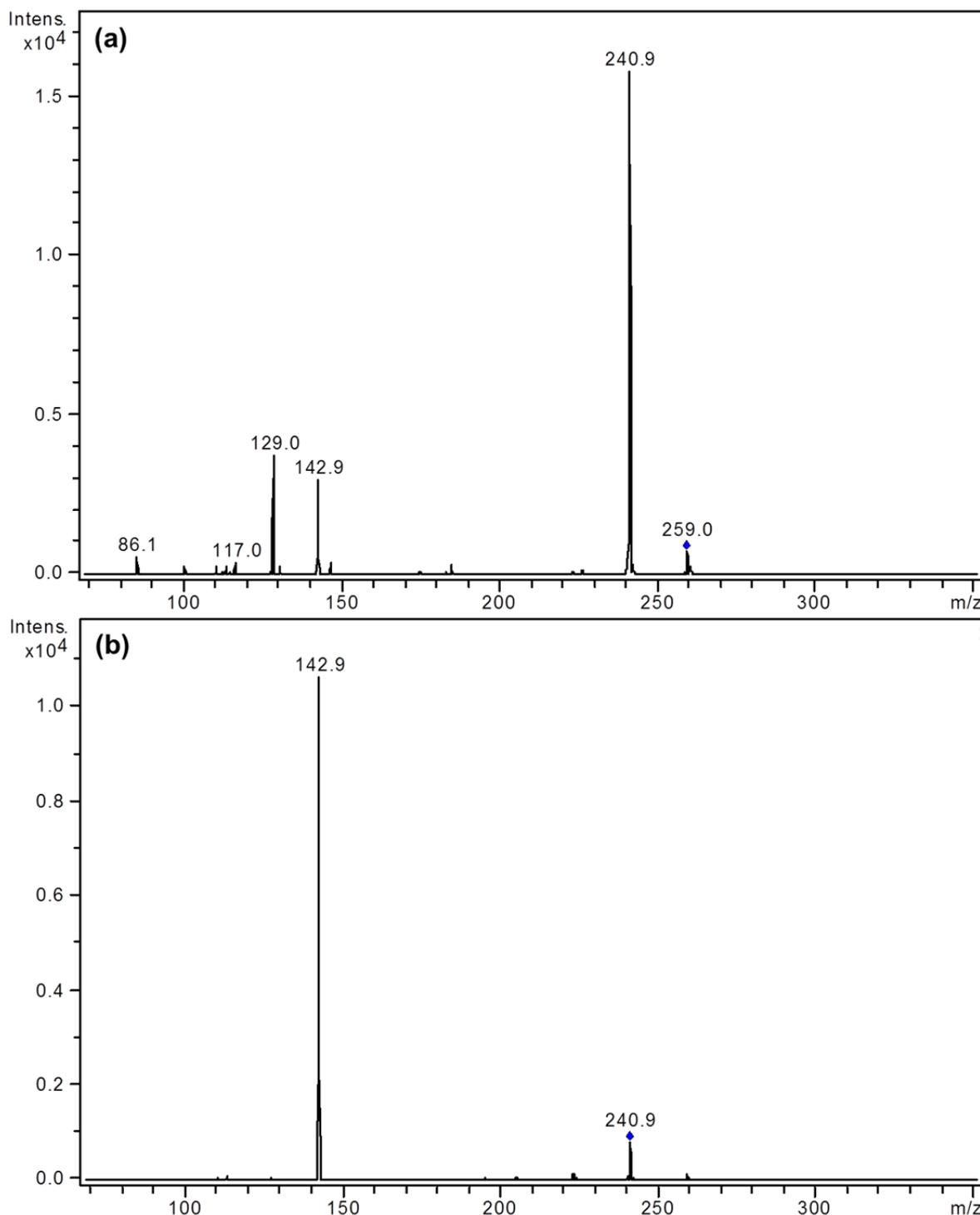


FIGURA 2.9 - Espectro de íons fragmentos do metabólito do LPSF-PT-31 proveniente do metabolismo em HLMs (a) MS² m/z 259, (b) MS³ m/z 241. Aquisição dos dados: *cut off* 65, amplitude de fragmentação de 0,43 V para MS² (m/z 259) e 0,35 V para MS³ (m/z 241).

Para se obter informações estruturais adicionais do metabólito gerado, experimentos de LC-MSⁿ foram realizados. Inicialmente, o espectro de íon produto da molécula protonada do LPSF-PT-31 (m/z 243) foi obtido. Nesse experimento foi observado a formação de três íons produtos característicos: m/z 143, m/z 113 e m/z

85, sugerindo a perda do anel imidazolidina-2,4-diona $[M+H-C_3H_4N_2O_2]^+$, perda do grupo 2-cloro-6-fluorofenil $[M+H-C_6H_4ClF]^+$ e a perda do grupo 2-cloro-6-fluorofenil $[M+H-C_6H_4ClF]^+$ seguido da perda de uma molécula de monóxido de carbono $[M+H-C_6H_4ClF-CO]^+$, respectivamente. O espectro de MS^2 e a proposta de fragmentação do LPSF-PT-31 estão ilustrados na Figura 2.10.

Estes três íons produtos obtidos a partir dos experimentos de MS^2 do LPSF-PT-31 podem atuar como íons de diagnóstico para identificar o hidróxi-metabólito (M1) formado a partir do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31, desde que no padrão de fragmentação do metabólito desconhecido pelo menos um dos íons produtos observados também esteja presente no padrão de fragmentação do LPSF-PT-31.

As Figuras 2.8 e 2.9 ilustram os espectros de MS^2 e MS^3 do M1 em RLMs e HLMs, respectivamente. O espectro de íons produtos da molécula protonada do M1 (m/z 259) em ambos os sistemas utilizados para incubação (RLMs e HLMs) apresentou como íon principal m/z 241, e o experimento de MS^3 para m/z 241 gerou o íon m/z 143. Comparando os espectros de íons produtos do LPSF-PT-31 e M1 observou-se um íon produto em comum para ambos os compostos, o m/z 143, que corresponde ao grupo 2-cloro-6-fluorobenzil $[M+H-C_7H_5ClF]^+$ da molécula do LPSF-PT-31, indicando que esta região aromática manteve-se inalterada durante o metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31. Adicionalmente, observou-se a ausência do íon produto m/z 113 e a presença de um novo íon produto m/z 129 no espectro de íons produtos da molécula protonada do M1 (m/z 259) em ambos os sistemas utilizados para incubação (RLMs e HLMs), o que corresponde ao incremento de 16 Da no anel imidazolidina-2,4-diona. De acordo com o íon produto m/z 143 e m/z 129, foi postulado que a biotransformação do LPSF-PT-31 envolve uma hidroxilação no anel imidazolidina. Embora os experimentos de massa tenham fornecido informações importantes sobre o padrão de fragmentação do LPSF-PT-31 e M1, a posição precisa da hidroxilação não pôde ser identificada com base apenas na comparação dos padrões de fragmentação. Portanto, para a identificação estrutural de M1, experimentos de RMN foram necessários.

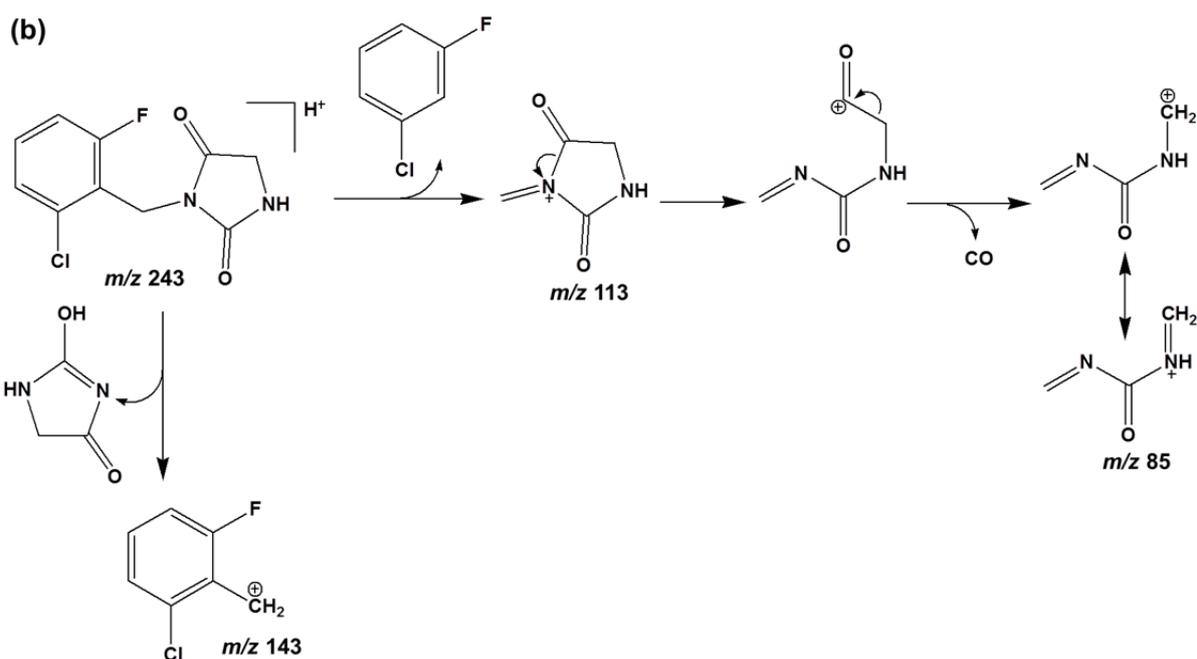
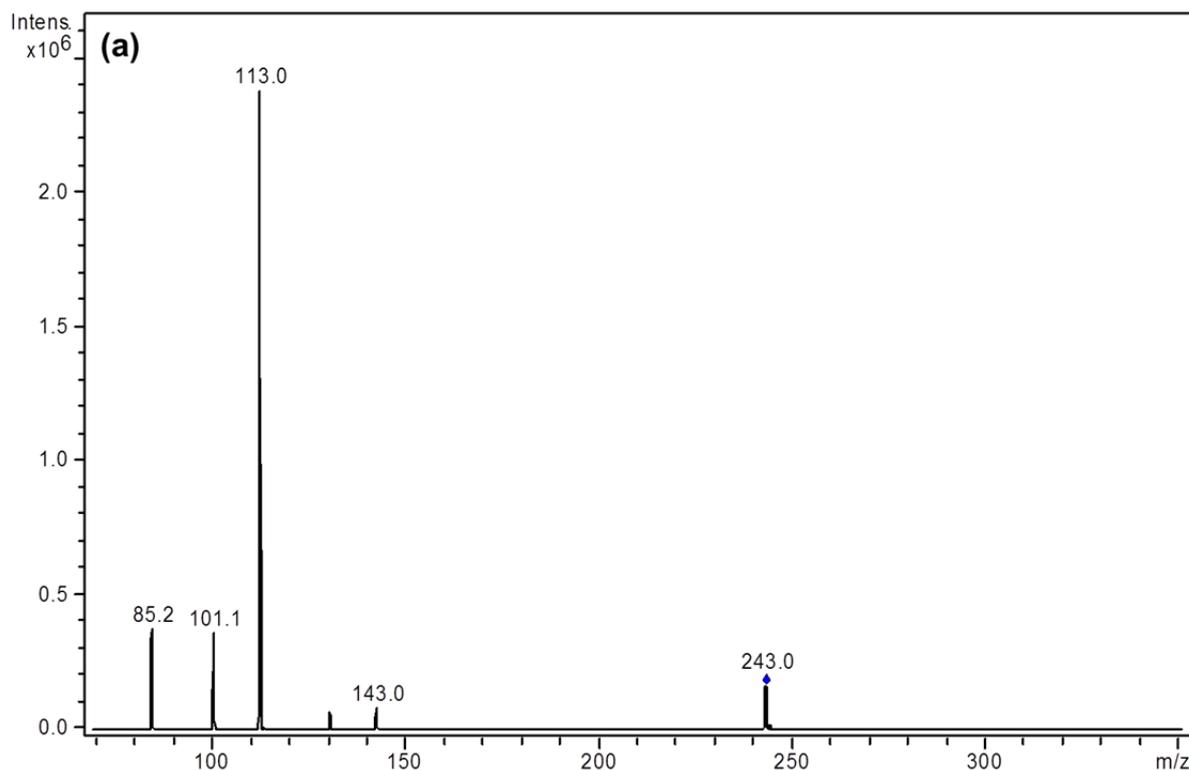


FIGURA 2.10 – (a) Espectro de íons produtos (MS²) da molécula protonada do PSF-PT-31 (*m/z* 243) e (b) sua proposta de fragmentação. Aquisição dos dados: *cut off* 65 e amplitude de fragmentação de 0,30 V.

2.3.5. Identificação estrutural do metabólito do LPSF-PT-31 por RMN

Espectroscopia de RMN tem desempenhado um papel importante na caracterização estrutural de metabólitos. Embora o RMN tenha uma baixa sensibilidade em comparação com a análise por MS, esta técnica tem muitas vantagens, tais como ser não-destrutiva, fornecer atribuição estrutural inequívoca e informações sobre isômeros e conformações e configurações moleculares por interpretação dos deslocamentos químicos e padrões de desdobramento dos sinais devido as interações nucleares mediadas por acoplamento spin-spin (*J couplings*).¹³⁷ Assim, neste trabalho, a técnica de RMN foi utilizada para caracterizar estruturalmente o metabólito desconhecido detectado nas amostras de biotransformação do LPSF-PT-31.

Para identificar a posição correta da hidroxilação e, assim, obter a completa caracterização do metabólito do LPSF-PT-31, espectro de hidrogênio (¹H-RMN) do M1 foi obtido e comparado como o espectro ¹H-RMN do LPSF-PT-31 (Figura 2.11). A Tabela 2.6 resume os deslocamentos químicos e a multiplicidades do LPSF-PT-31 e M1. Em comparação ao substrato nenhuma diferença significativa nos deslocamentos químicos do grupo benzil foi observada, excluindo a possibilidade de hidroxilação no CH₂ benzílico. Entretanto, três principais mudanças foram observadas no anel imidazolidina, incluindo desblindagem do ¹H a partir da ligação N-H (1^a posição) de 6,19 para 6,71 ppm, a perda do sinal do CH₂ (5^a posição) e a presença de um novo sinal de singleto em 4,61 ppm, o qual integra para 1H e exibe um deslocamento químico consistente com um próton ligado ao grupo C-OH. Além dos experimentos de ¹H também foi feita uma tentativa de adquirir experimentos bidimensionais (COSY e HSQC), mas mesmo utilizando uma sonda criogênica não foi possível obter nenhum sinal, devido à quantidade insuficiente de massa do metabólito. Entretanto, espectros 1D-¹H forneceram dados suficientes para concluir que a hidroxilação ocorreu na 5^a posição do anel imidazolidina levando à formação do 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-hidroxiimidazolidina-2,4-diona.

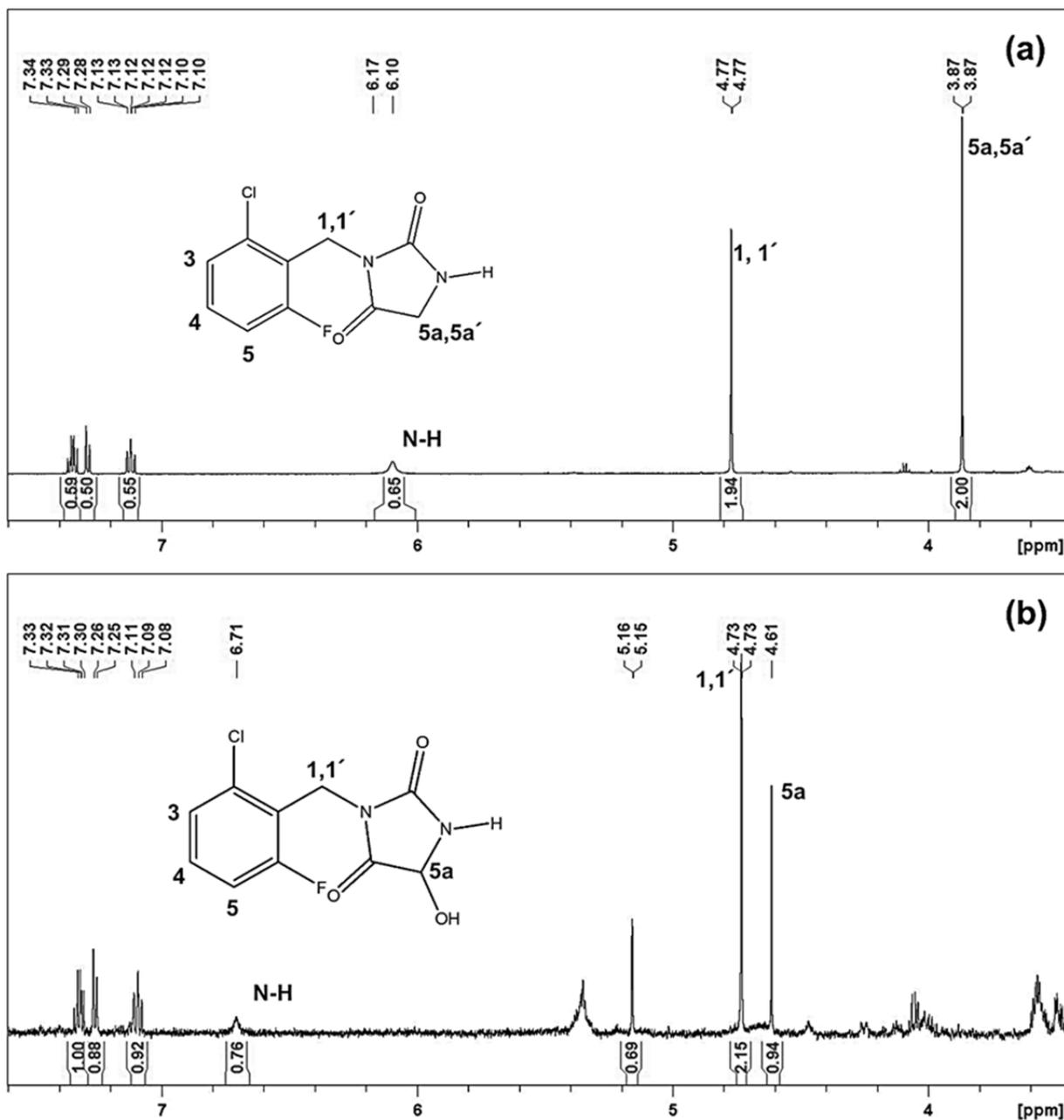


FIGURA 2.11 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (a) LPSF-PT-31, (b) metabólito do LPSF-PT-31. Ambas amostras foram dissolvidas em CD_3CN . Condições RMN (Bruker Avance III-600): sonda criogênica de 5mm TCI $^1\text{H} \{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$. Sequência de pulsos ^1H RMN: 1D version NOESY sequence; supressão de água e acetonitrila: $d1=2,40$ s; 64.000 pontos em uma janela espectral de 12.019,23 Hz; tempo aquisição= 2,73 s; $ns=256$ scans.

TABELA 2.6- Deslocamento químico e multiplicidade do LPSF-PT-31 e M1

Hidrogênio	δ (LPSF-PT-31)	Multiplicidade	δ (M1)	Multiplicidade
1,1'	4,77	d (1,05Hz)	4,73	d (1,07 (Hz)
5a, 5a'	3,87	d (1,27 Hz)	4,61	s
NH	6,10	largo	6,71	largo
3 (aromático)	7,28	m	7,26	m
4 (aromático)	7,35	m	7,32	m
5 (aromático)	7,12	m	7,08	m

Combinando a completa elucidação estrutural do M1 por RMN e os experimentos de LC-MSⁿ, foi possível sugerir uma proposta de fragmentação para M1 (Figura 2.12). Onde os íons produtos m/z 241, m/z 143 e m/z 117 sugerem a eliminação de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$ seguido da perda do anel imidazolidina-2,4-diona $[M+H-H_2O-C_3H_3N_2O_2]^+$ levando a formação do íon m/z 143, o qual é o íon produto presente também no espectro de íons produtos do LPSF-PT-31 e leva à formação do íon m/z 117 através da perda de uma molécula de etino por intermédio do íon tropílico $[M+H-H_2O-C_3H_3N_2O_2-C_2H_2]^+$. Os íons produtos m/z 129 e m/z 86 sugerem a perda do grupo 2-cloro-6-fluorofenil $[M+H-C_6H_4ClF]^+$ seguido da perda do grupo CONH $[M+H-C_6H_4ClF-CONH]^+$, respectivamente.

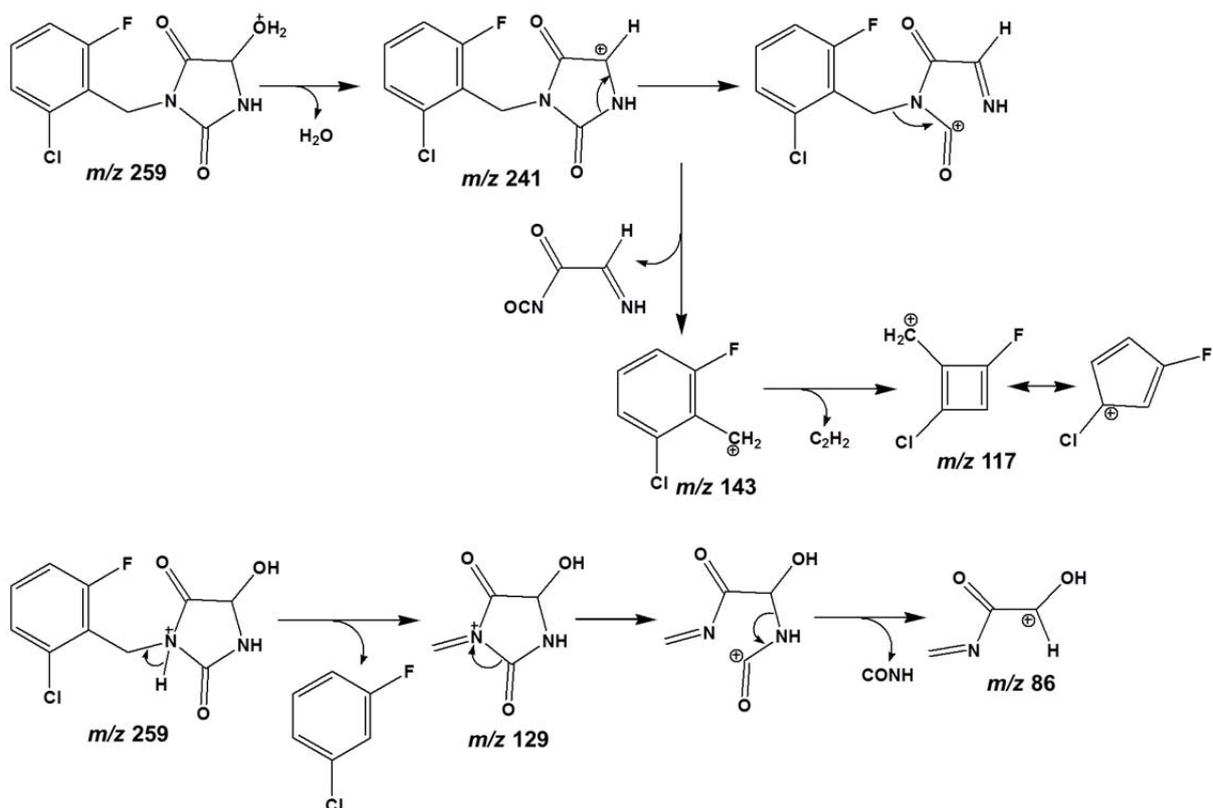


FIGURA 2.12 - Proposta de fragmentação para o metabólito do LPSF-PT-31 considerando a hidroxilação no anel imidazolidina.

De acordo com as condições de incubação usadas nos ensaios *in vitro* e a característica química e estrutural da molécula do LPSF-PT-31, esperava-se obter através do metabolismo via CYP P450 metabólitos provenientes de reações metabólicas de fase I a partir da hidroxilação da molécula no anel aromático, hidroxilação alifática, N-hidroxilação e metabólitos secundários. Todas estas possibilidades também foram exploradas durante o processamento dos dados de LC-MS e LC-MSⁿ e nenhum outro metabólito foi detectado nas amostras de biotransformação e apenas um hidroxí-metabólito majoritário foi obtido a partir do metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 em HLMs e em RLMs, nas condições analíticas empregadas. No entanto, estes metabólitos podem ter se formado em quantidades abaixo do limite de detecção do método de análise, apesar de os experimentos terem sido realizados em larga escala. Assim, o uso de equipamentos de espectrometria de massa providos de analisadores de massa mais sensíveis que o *ion trap*, por exemplo, o *QTrap*; e ainda, o emprego de *softwares* que auxiliam na otimização dos métodos de aquisição e na detecção de metabólitos, podem levar a

identificação de novos metabólitos. Resumidamente, a Figura 2.13 ilustra reação metabólica proposta para LPSF-PT-31 a partir dos estudos de metabolismo *in vitro* em microssomas de fígado humano e de rato.

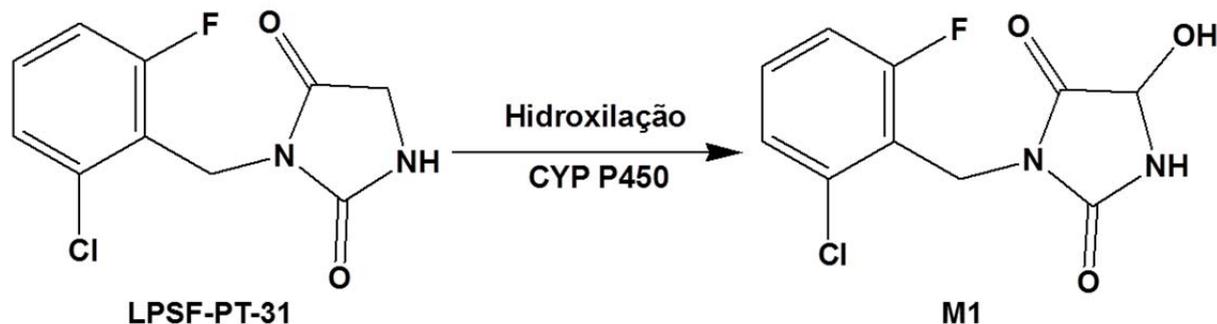


FIGURA 2.13 - Reação metabólica proposta para LPSF-PT-31 a partir do metabolismo *in vitro* em microssomas de fígado humano e de rato.

Deste modo, os dados de metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 nas condições experimentais desenvolvidas possibilitaram a identificação de um único metabólito proveniente de uma reação de hidroxilação, sendo este o metabólito M1; 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-hidroxi-imidazolidina-2,4-diona. Infelizmente, dados do metabolismo *in vivo* do LPSF-PT-31 ainda não estão disponíveis na literatura para promover maiores discussões. No entanto, o perfil metabólico do LPSF-PT-31, observado nos ensaios *in vitro* realizados neste estudo, foi semelhante ao observado para o perfil metabólico do seu análogo, clonidina. Como observado para o LPSF-PT-31, a clonidina também sofre metabolismo de fase I e produz *in vitro* e em humanos, majoritariamente, o hidroxi-metabólito, 4-hidroxi-clonidina.¹³⁸

O metabólito M1 identificado no presente trabalho é um composto quiral, assim os enantiômeros podem apresentar maior atividade farmacológica que o LPSF-PT-31, caso este composto seja um pró-fármaco. Ainda, os enantiômeros do M1 podem também apresentar atividades farmacológicas ou toxicológicas distintas entre si. Adicionalmente, SUDO et al. (2010)¹²⁹ demonstraram através de estudos de *docking* que o LPSF-PT-31 apresenta uma maior afinidade que a clonidina pelo sítio ativo do adrenoceptor α_{2A} . Este efeito foi explicado por experimentos *in silico* por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo cetona no anel de imidazolidina do LPSF-PT-31 e o resíduo de aminoácido Ile-190 do adrenoceptor α_{2A} . Considerando este estudo, pode-se sugerir que o metabólito M1, possivelmente

apresente uma maior afinidade ao sítio ativo do adrenoceptor α_{2A} devido à presença do grupo hidroxila no anel imidazolidina proveniente da reação metabólica. Portanto, avaliações farmacocinéticas e farmacológicas adicionais para verificar uma possível atividade farmacológica ou toxicológica dos enantiômeros do metabólito M1, bem como a identificação das isoformas de CYP P450s envolvidas no metabolismo do LPSF-PT-31 são necessárias a fim de determinar se o LPSF-PT-31 pode ou não ser um pró-fármaco. A síntese em larga escala do metabólito M1 está sendo realizada pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), coordenado pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, e a separação quiral preparativa será realizada para a obtenção dos enantiômeros puros para serem empregados em estudos de metabolismo *in vitro* e outros ensaios biológicos posteriores.

2.4. Conclusões

O presente estudo demonstrou a aplicabilidade das técnicas de LC-MS e RMN no estudo de metabolismo *in vitro* e identificação estrutural de metabólitos, através da obtenção das primeiras informações sobre o metabolismo do LPSF-PT-31.

Para avaliar o metabolismo *in vitro* do LPSF-PT-31 em microssomas de fígado de rato e humano e identificar os possíveis metabólitos formados, foi desenvolvido e aplicado um método de LC-MS utilizando uma fonte de ionização por *electrospray* no modo de ionização positiva. Como ferramenta no processo de otimização das condições de incubação foi utilizado um planejamento experimental 2^4 .

Nas condições experimentais desenvolvidas e otimizadas para os ensaios de metabolismo e análises por LC-MS, um metabólito majoritário do LPSF-PT-31 foi detectado. Os resultados do presente estudo revelam que LPSF-PT-31 sofre metabolismo mediado por CYP P450 em microssomas de fígado ratos e humano por meio de uma reação de hidroxilação, produzindo um hidroximetabólito principal. LPSF-PT-31 apresentou um perfil metabólico semelhante em ambas as espécies estudadas, com uma maior taxa de metabolismo em ratos, o que sugere uma maior exposição ao fármaco em seres humanos. A identificação estrutural do metabólito do LPSF-PT-31 foi estabelecida através de análises por RMN e LC-MSⁿ, o que indicou

que a reação de hidroxilação ocorreu na posição 5 do anel de imidazolidina levando a produção do metabólito 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-hidroxi-imidazolidina-2,4-diona. Estes resultados fornecem uma compreensão inicial do metabolismo LPSF-PT-31 e, podem ser utilizados como uma referência para futuras investigações do metabolismo do LPSF-PT-31 tais como, estudos farmacocinéticos, de fenotipagem enzimática e estudos farmacológicos, a fim de verificar atividade farmacológica dos enantiômeros do metabólito M1.

CAPÍTULO 3

3. Estudos de Fenotipagem Enzimática e Avaliação da Contribuição das Enzimas CYPs e UGTs no Metabolismo do Montelukaste

3.1. Montelukaste

Montelukaste (Figura 3.1), sal monossódico do ácido [R-(E)]-1-[[[1-[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil) etenil] fenil]-3-[2-(1-hidróxi-1-metiletil) fenil] propil]tio]metil] ciclopropanoacético, é um antagonista potente e seletivo de receptores leucotrienos cisteínicos subtipo 1 (CysLT1); receptores específicos dos leucotrienos D4, os quais são responsáveis pelo processo inflamatório no sistema respiratório e, assim, pela resposta asmática.^{139,140}

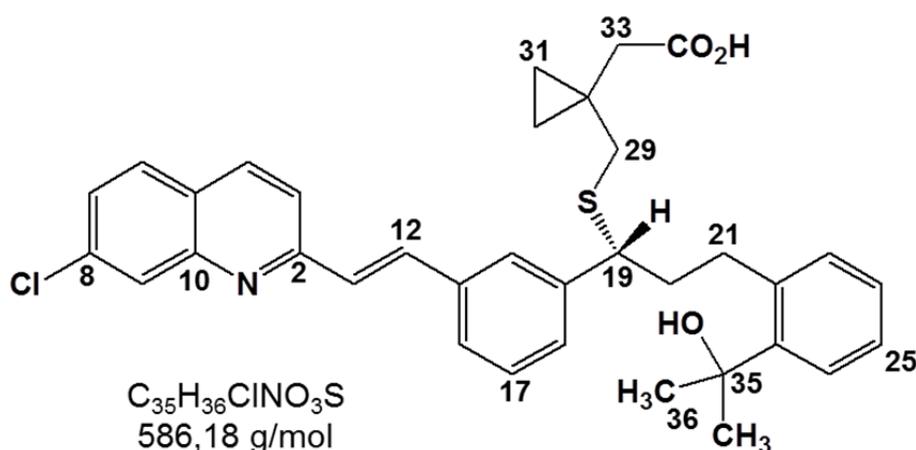


FIGURA 3.1 - Estrutura química do montelukaste.

O montelukaste foi introduzido no mercado no final da década de 1990 e tem sido utilizado para a profilaxia e tratamento da asma e rinite alérgica em pacientes adultos e pediátricos a partir de seis meses de idade.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ O montelukaste pode ser usado como uma alternativa à baixa dose de corticosteróides inalatórios (ICS - *inhaled corticosteroids*) para pacientes que respondem mal aos ICS ou, em adição aos ICS para maiores melhorias nos sintomas e na função pulmonar, particularmente em doentes ainda sintomáticos, apesar do tratamento com ICS.¹⁴⁵⁻

¹⁴⁸ O montelucaste tem sido utilizado também para o tratamento de diferentes fenótipos de asma, tais como na asma induzida por exercícios físicos^{149,150} e em asma associada com a rinite alérgica.^{151,152} Além disso, o montelucaste pode ser recomendado para o tratamento da asma em pacientes obesos,¹⁵³ asma em fumantes,¹⁵⁴ asma induzida por aspirina¹⁵⁵ e episódios de sibilância induzida por vírus.^{156,157}

Em seres humanos, o montelucaste é rapidamente absorvido e após a administração de 10 mg de montelucaste para adultos, a concentração máxima no plasma (C_{max}), a meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) e a biodisponibilidade oral é de 495,3-602,8 ng/mL ($\sim 1,0 \mu\text{mol/L}$), 5 - 6 horas e 64,0%, respectivamente.^{142,158} O montelucaste sofre um metabolismo oxidativo com montelucaste inalterado e a maioria dos metabólitos sendo excretado via bile e menos de 1,0% eliminado na urina. O perfil qualitativo do montelucaste e seus metabólitos na bile humana (4 - 6 horas após a ingestão oral do montelucaste) indicam que o montelucaste é submetido à oxidação extensiva em vários metabólitos primários. Os principais metabólitos identificados em amostras de plasma e bile de humanos incluem montelucaste acil- β -D-glucuronídeo (M1), montelucaste sulfóxido (M2), 25-hidroxi-montelucaste (M3), ácido dicarboxílico montelucaste (M4), 21(R)-hidroxi-montelucaste (M5a), 21-(S)-hidroxi-montelucaste (M5b) e 36-hidroxi-montelucaste ou 1,2-diol montelucaste (M6) (Figura 3.2).¹⁵⁹

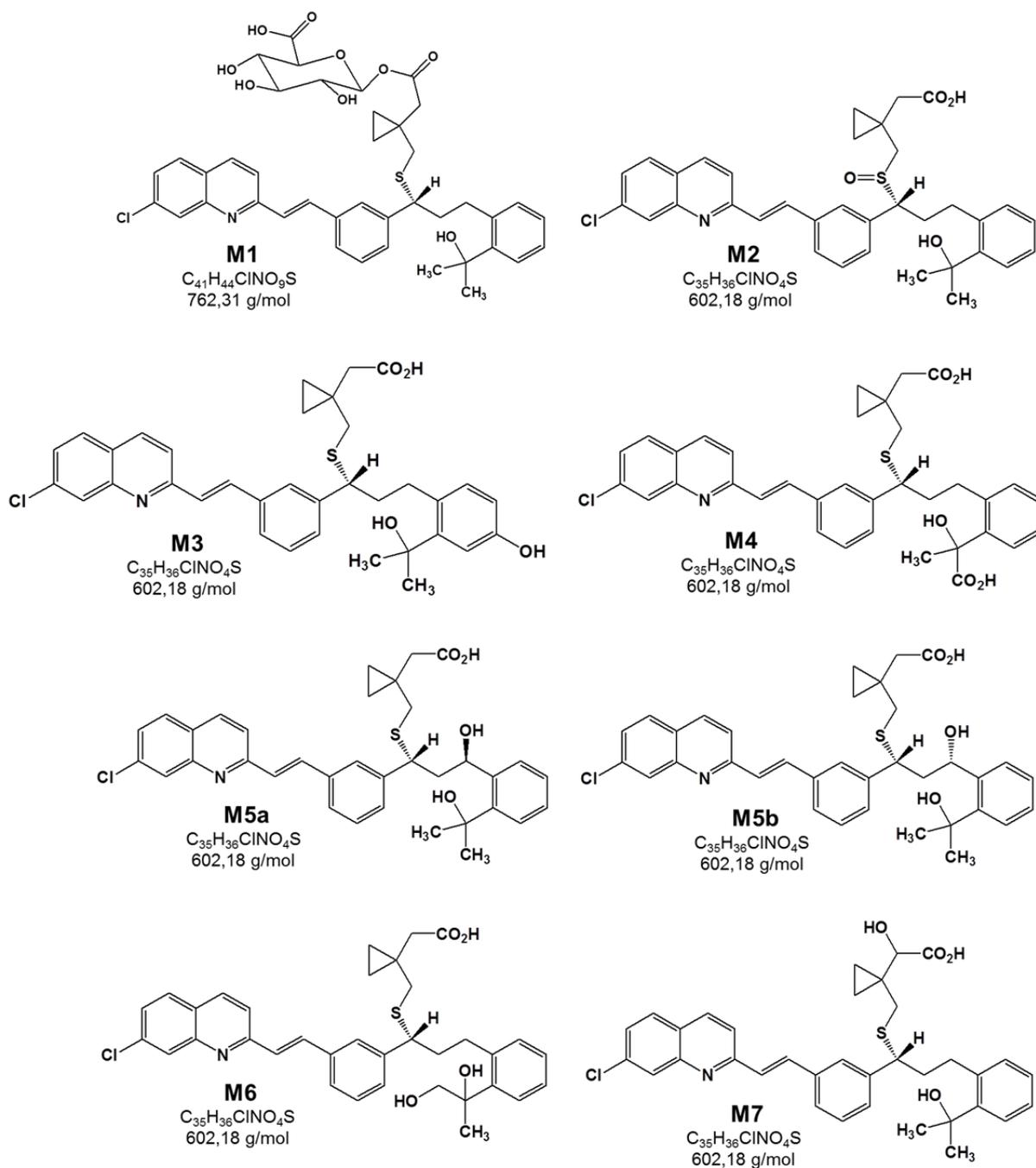


FIGURA 3.2 - Estrutura química dos metabólitos do montelucaste. M1: montelucaste acil- β -D-glucuronídeo; M2: montelucaste sulfóxido; M3: 25-hidroxi-montelucaste; M4: ácido dicarboxílico montelucaste; M5a: 21(R)-hidroxi-montelucaste; M5b: 21(S)-hidroxi-montelucaste; M6: montelucaste 1,2-diol e M7: α -hidroxi-montelucaste.

O montelucaste apresenta múltiplas interações com as enzimas do citocromo P450. Inicialmente, estudos *in vitro* sugeriram que montelucaste é um inibidor altamente potente da CYP2C8.⁵¹ No entanto, o dados clínicos de estudos de interação medicamentosa do montelucaste com rosiglitazona,¹⁶⁰ pioglitazona¹⁶¹ e

repaglinida¹⁶² demonstraram que a farmacocinética destes fármacos não é alterada quando estes medicamentos são co-administrados com montelucaste, indicando que o montelucaste não é um inibidor da CYP2C8 *in vivo*. Diversas outras interações medicamentosas envolvendo o montelucaste são reportadas na literatura. Fenobarbital, um indutor da CYP3A4, diminuiu a AUC (*area under the concentration-time curve*) do montelucaste em aproximadamente 40,0%.¹⁴² Claritromicina um potente inibidor da CYP3A4, aumentou a AUC do montelucaste em aproximadamente 144,0%.¹⁶³ O gemfibrozil um inibidor *in vivo* da CYP2C8^{88,164,165} e OATP2B1 (OATP - *organic anion transporting polypeptide*),^{164,166} em dose terapêutica, aumentou a exposição sistêmica ao montelucaste em cerca de 4,4 vezes; enquanto o itraconazol, um potente inibidor da CYP3A4 não afetou a sua eliminação.¹⁶⁷

Apesar dos vários estudos sobre as características farmacocinéticas e interações medicamentosas do montelucaste e da identificação dos vários metabólitos oxidativos do montelucaste, a contribuição destes para a eliminação (*clearance*) total do montelucaste e as enzimas específicas que catalisam sua formação permanecem questionáveis. O 36-hidroxi-montelucaste e seu metabólito secundário ácido dicarboxílico montelucaste foram descritos como sendo o principal mecanismo de eliminação do montelucaste.¹⁵⁹ Assim, o metabolismo do montelucaste para estes e outros metabólitos oxidativos têm sido objeto de vários estudos *in vitro*^{168,169} e *in vivo*.^{167,170} Os primeiros estudos de metabolismo *in vitro* do montelucaste mostraram que a CYP3A4 e CYP2C9 são as principais enzimas envolvidas no metabolismo do montelucaste, onde a CYP2C9 é descrita como sendo a responsável pela formação do metabólito majoritário 36-hidroxi-montelucaste. No entanto, estes estudos foram realizados em concentrações muito elevadas de montelucaste (100-500 µmol/L) em relação à concentração máxima no plasma (~1,0 µmol/L).¹⁷¹ Estudos mais recentes, realizados em concentrações terapêuticas relevantes do montelucaste^{168,169} indicam a CYP2C8 como a principal enzima envolvida na formação do metabólito 36-hidroxi-montelucaste. A potencial contribuição da CYP2C8 é ainda suportada por outros estudos que demonstram que o montelucaste tem alta afinidade pelo sítio ativo da CYP2C8¹⁷² e, ainda que o montelucaste é um potente inibidor competitivo desta enzima *in vitro*.⁵¹ Adicionalmente, estudos *in vivo* em voluntários saudáveis, demonstraram que a administração concomitante do montelucaste com gemfibrozil diminui a formação

dos metabólitos 36-hidroxi-montelucaste e do ácido dicarboxílico montelucaste e, conseqüentemente, aumenta acentuadamente a exposição ao montelucaste.^{167,170} Uma vez que o gemfibrozil é um potente inibidor de CYP2C8^{88,164,165} e com base na extensão da interação gemfibrozil-montelucaste, os autores sugeriram que a CYP2C8 é responsável por cerca de 80,0% do *clearance* total do montelucaste.¹⁶⁷ Como resultado, o montelucaste foi recomendado como um marcador seletivo para atividade da CYP2C8 *in vivo*.^{167,170} No entanto, uma análise detalhada dos estudos *in vitro* indica que outras CYPs além da CYP2C8 também podem estar envolvidas na eliminação do montelucaste. Além disso, o efeito substancial do gemfibrozil no metabolismo do montelucaste^{167,170} pode envolver efeitos sobre outras enzimas/proteínas, além de inibição da CYP2C8. Esta sugestão é suportada pelas diversas outras interações medicamentosas descritas para o montelucaste. Portanto, a hipótese de que o metabolismo via CYP2C8 é o principal mecanismo de eliminação do montelucaste é questionável.

Adicionalmente, o montelucaste apresenta em sua estrutura dois grupos funcionais; sendo estes um grupo carboxílico e uma hidroxila; suscetíveis a reações de conjugação (Figura 3.1), levantando também a possibilidade de que o montelucaste possa sofrer conjugação direta via uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferases (UGTs). Além disso, o montelucaste acil- β -D-glucuronídeo foi identificado em amostras de bile após a administração de montelucaste a humanos,¹⁵⁹ e em estudos *in vitro* utilizando microsomas de fígado humano.¹⁷¹ No entanto, devido à falta de uma análise quantitativa do balanço de massas do montelucaste, a contribuição relativa das reações oxidativas e de glucuronidação no metabolismo e eliminação do montelucaste, bem como a identificação das enzimas específicas responsáveis pela glucuronidação do montelucaste permanecem desconhecidas.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram realizar estudos de metabolismo *in vitro* do montelucaste utilizando microsomas de fígado humano (HLMs) e CYPs e UGTs expressas para: 1) avaliar a contribuição relativa das reações de oxidação e conjugação via CYPs e UGTs para a eliminação total do montelucaste; 2) investigar a influência das condições de incubação no metabolismo do montelucaste via CYPs e UGTs; 3) obter a melhor condição de incubação para estimar a contribuição das UGTs e CYPs no *clearance in vitro* do montelucaste; 4) reavaliar detalhadamente as CYPs específicas envolvidas no metabolismo oxidativo do montelucaste; e 5)

identificar metabólitos provenientes de reações de glucuronidação do montelucaste e as UGTs específicas envolvidas.

3.2. Procedimento experimental

3.2.1. Materiais

Montelucaste de sódio, montelucaste 1,2 diol, montelucaste sulfóxido, 21(S)-hidroxi-montelucaste, 21(R)-hidroxi-montelucaste, α -hidroxi-montelucaste, montelucaste acil- β -D-glucuronídeo e nevirapina, foram obtidos da Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada).

Glicose 6-fosfato (G6P), Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (*S. cerevisiae*), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), sal trissódico de uridina 5'-difosfato ácido glucurônico (UDPGA), alamecicina, sacarolactona, cloridrato de pilocarpina, quercetina, quinidina, cetoconazol, sulfafenazol, trietilenotiofosforamida (tiotepa), cloridrato de ticlopidina e troleandomicina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

As frações microsossomais de fígado humano (5 *pools* de fígados humanos (n= 20-50) e nove frações de fígados humanos individuais); CYPs humanas expressas (supersomas) CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP4A11 com oxidoredutases e sem co-expressão do citocromo b5 (exceto CYP2E1) e UGTs humanas expressas UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B15, UGT2B17 foram obtidas da BD Gentest ou Corning (Woburn, MA). Todas as frações microsossomais e enzimas expressas foram estocadas a -80°C.

Os sais fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), carbonato de sódio, cloreto de magnésio e os solventes metanol, acetonitrila e éter metil *t*-butílico (MTBE), ácido fórmico e ácido clorídrico grau HPLC foram obtidos da Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

A água utilizada na composição das fases móveis e preparo de soluções foi obtida através de um sistema Milli-Q (Millipore).

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo modelo AG104, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

As soluções salinas foram filtradas a vácuo em um sistema Millipore, utilizando membranas de nylon Phenomenex de 0,45 µm.

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro OAKTON modelo 1100, com precisão ± 0,01 unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampões pH 4,0, 7,0 e 10,0 (Fisher Scientific).

As fases móveis preparadas foram degaseificadas utilizando um ultrassom Branson modelo B 5510 MTH (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram da marca Eppendorf, e a homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex GENIE 2, modelo G-560 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

As incubações foram realizadas em um banho-maria da Fisher Scientific modelo Isotemp 210 (Hayward, CA, USA).

No tratamento de amostras por extração líquido-líquido foi utilizado uma centrífuga da Eppendorf, modelo 5415C (Brinkmann Instruments, Westbury, NY); um agitador de tubos da Eberbach Corporation, modelo 6010; uma centrífuga refrigerada Beckman Coulter, modelo Allegra 6R (Woburn, Massachusetts, USA) e um sistema concentrador de amostra Savant, modelo SVC 200H.

Todas as soluções padrões foram preparadas dissolvendo os inibidores/fármacos em estudo em água, metanol ou acetonitrila e estocadas a -80°C.

3.2.2. Condições analíticas para a determinação do montelucaste e seus metabólitos por LC-MS

O desenvolvimento e otimização das condições analíticas para análise do montelucaste e seus metabólitos por LC-MS/MS foi realizado em um sistema cromatográfico (Shimadzu, Addison, IL) equipado com um auto-injetor modelo SIL-20A HT e uma bomba modelo 20AB; acoplado a um espectrômetro de massa modelo API 2000 provido de um analisador de massa triplo quadrupolo e uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (Applied Biosystems Foster City, CA), operado no modo positivo de ionização.

A separação cromatográfica do montelucaste e de seus metabólitos foi obtida empregando uma coluna Luna C18 (100 x 2,0 mm; 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA) à temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$), utilizando o modo de eluição isocrática com fase móvel constituída de acetonitrila/água acidificada (0,1% de ácido fórmico) na proporção de 85:15 (v/v) para a separação do montelucaste e seus hidroximetabólitos e 82:18 (v/v) para a separação do montelucaste e seus glucuronídeos, vazão de 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 µL.

Os parâmetros do MS foram inicialmente otimizados através da inserção direta e individual das soluções padrões de montelucaste, 21(R)-hidroximontelucaste (M5a) e montelucaste 1,2 diol (M6) na concentração de 100 ng/mL e de montelucaste sulfóxido (M2), 21(S)-hidroximontelucaste (M5b), α -hidroximontelucaste (M7) e montelucaste acil- β -D-glucuronídeo (M1) na concentração de 1,0 µg/mL. As soluções foram preparadas através da diluição em metanol/água (50:50, v/v) das soluções estoques em metanol (1,0 mg/mL) e a inserção foi realizada com o auxílio de uma bomba seringa na vazão de 10 µL/min. O sistema de MS foi operado utilizando uma voltagem do *electrospray* de + 5200 V, *dwell time* de 100 ms, temperatura de interface de 0°C , nitrogênio como gás nebulizador (GS1- *nebulizer gas*) 20 psi e gás de secagem (CUR - *curtain gas*) 20 psi. Os ensaios de inserção direta permitiram a obtenção dos parâmetros de ionização (Tabela 3.1), os quais foram também utilizados no processo de otimização dos parâmetros do MS comuns aos compostos em análise, por meio de análises por injeção em fluxo (FIA - *flow injection analysis*).

O experimento FIA foi realizado via LC-MS na ausência de uma coluna cromatográfica, utilizando como fase móvel acetonitrila/água (50:50, v/v) na vazão de 0,2 mL/min e múltiplas injeções (10 µL) de uma solução contendo montelucaste, seus metabólitos e nevirapina (padrão interno) na concentração de 1,0 µg/mL em metanol/água (50:50, v/v). Em cada injeção, diferentes valores de um determinado parâmetro em processo de otimização foram testados e o valor mais favorável à análise dos compostos foi definido automaticamente. Os parâmetros independentes do composto em análise foram determinados utilizando a voltagem do *electrospray* de + 4000 mV; *dwell time* 100 ms; temperatura de interface de 350°C ; gás nebulizador 30,0 psi; gás de aquecimento (GS2- *heater gas*) 40,0 psi; gás de secagem 20,0 psi e gás de colisão (CAD - *collision activated dissociation*) 4,0 psi.

Após a otimização dos parâmetros analíticos, as análises por LC-MS foram realizadas com o MS operando sob as seguintes condições: gás de secagem 25,0 psi, temperatura de interface de 550°C, gás nebulizador (GS1) 20,0 psi, gás de aquecimento 55,0 psi, voltagem do *electrospray* de + 5500 V e gás de colisão (CAD) 4,0 psi. Para a aquisição dos dados o triplo quadrupolo foi operado no modo monitoramento de reação selecionada (SRM – *Selected Reaction Monitoring*). As transições (íon precursor > íon produto) selecionadas para o monitoramento do montelukaste e seus metabólitos estão descritos na Tabela 3.1.

O padrão analítico do metabólito 25-hidroxi-montelukaste (M3) não estava disponível e as transições adotadas para o monitoramento deste metabólito foram previamente descritas por BALANI et al. (1997).¹⁵⁹ A aquisição e processamento dos dados foram realizados utilizando o software Analyst® version 1.5.1 (AB SCIEX™, Ontario, Canada).

TABELA 3.1 - Transições monitoradas para análise do montelukaste e seus metabólitos e os parâmetros do MS específicos para cada analito

Analito	Transição (<i>m/z</i>)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
montelukaste	586 > 422	71,0	360,0	11,0	33,0	33,0	12,0
M1	762 > 422	16,0	370,0	9,5	32,0	45,0	12,0
M2	602 > 422	51,0	370,0	11,0	33,0	33,0	10,0
M3	602 > 438	80,0	360,0	10,0	33,0	40,0	16,0
	602 > 147						
M5a/b	602 > 147	61,0	400,0	11,0	33,0	40,0	6,0
M6	602 > 438	80,0	360,0	10,0	33,0	40,0	16,0
M7	603 > 422	51,0	360,0	9,5	33,0	33,0	22,0
nevirapina	267 > 226	51,0	370,0	9,5	14,0	37,0	14,0

Declustering Potential (DP); Focusing Potential (FP); Entrance Potencial (EP); Collision Cell Entrance Potential (CEP); Collision Energy (CE); Collision Cell Exit Potential (CXP).

3.2.3. Otimização das condições de metabolismo *in vitro* do montelukaste

Para realização dos ensaios de metabolismo *in vitro*, soluções contendo o montelukaste foram preparadas em metanol nas concentrações requeridas e todo o

metanol foi evaporado até a secura antes da adição dos componentes do meio de incubação. Devido ao fato de o montelucaste ser um composto sensível à luz, todos os ensaios foram realizados na ausência de luz.

A fim de obter a melhor condição de incubação para as reações de metabolismo envolvendo as enzimas CYPs, UGTs e combinadas CYPs + UGTs, quatro condições de incubação foram avaliadas. As condições de incubação avaliadas seguem os procedimentos de condições gerais de metabolismo *in vitro* e diferem de acordo com as condições descritas na Tabela 3.2. As reações foram terminadas nos tempos de incubação pré-definidos: 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e/ou 90 min.

As condições de incubação foram avaliadas através do decaimento da área cromatográfica do montelucaste durante o processo de metabolismo, comparando a área cromatográfica do montelucaste na amostra incubada por 90 min com a área na amostra controle com tempo de incubação de zero min.

TABELA 3.2 – Condições de incubação avaliadas durante a otimização das condições de metabolismo *in vitro* do montelucaste

Condições	CYPs	UGTs	CYPs + UGTs
Condição I	Solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH 7,4)	Solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl ₂ (3,4 mmol/L), EDTA (1,15 mmol/L) e sacarolactona (115 µmol/L) (adaptado de KILFORD et al., 2009 ¹⁷³)	
Condição II	Solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl ₂ (5,0 mmol/L) (adaptado de WALSKY et al., 2012 ⁶³)		
Condição III	Solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl ₂ (3,3 mmol/L)		
Condição IV	Solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl ₂ (1,0 mmol/L) e sacarolactona (5,0 mmol/L) (adaptado de FISHER et al., 2000 ⁶¹)		

3.2.3.1. Preparo da solução tampão fosfato de sódio

A solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L) foi preparada pesando-se 5,68 g do sal fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e dissolvendo para um volume total de 200 mL com água. O pH da solução foi ajustado para 7,4 através da adição de uma solução de fosfato de sódio monobásico (0,2 mol/L). Por fim, a solução tampão foi filtrada através de uma membrana de 0,45 μm .

3.2.3.2. Preparo da solução tampão tris-HCl

A solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L) foi preparada pesando-se 1,21 g do sal tris- (hidroximetil)-aminometano e 47,6 mg de cloreto de magnésio (5,0 mmol/L) e dissolvendo para um volume total de 100 mL com água. O pH da solução tampão tris-HCl foi ajustado para 7,4 através da adição de HCl 12 N.

3.2.3.3. Preparo das soluções de cofatores

Para preparar a solução de UDPGA (12,5 mmol/L), pesou-se 8,08 mg de UDPGA e solubilizou-se para um volume total de 1,0 mL com solução tampão utilizado para incubação; solução tampão fosfato de sódio ou solução tampão tris-HCl, de acordo a condição de incubação adotada (Tabela 3.2)

O sistema gerador de NADPH foi preparado de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.5.3.

Para o preparo da solução de cofatores combinados (UDPGA + NADPH), pesou-se 8,08 mg de UDPGA e solubilizou-se para um volume total de 1,0 mL com a solução do sistema gerador de NADPH.

3.2.3.4. Condições gerais de metabolismo *in vitro* via CYP P450

Os ensaios investigativos iniciais para determinar as condições ótimas para o metabolismo oxidativo do montelucaste foram realizados em um eppendorf de 2,0 mL, onde adicionou-se montelucaste (0,05 $\mu\text{mol/L}$), 25 μL de HLMs (0,25 mg/mL) e 125 μL de solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH 7,4). Após 5 min de pré-incubação à 37°C a reação foi iniciada pela adição de 100 μL do sistema gerador de

NADPH [NADP^+ (1,3 mmol/L), glicose 6-fosfato (3,3 mmol/L), MgCl_2 (3,3 mmol/L) e glicose 6-fosfato desidrogenase (0,4 U/ μL)] com volume final de incubação de 250 μL . A reação foi realizada em um banho termostatizado à 37°C. Após o tempo de incubação desejado, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de acetonitrila levando a precipitação proteica. Nevirapina (25 μL ; 500 ng/mL em metanol) foi adicionada como padrão interno às amostras de incubação. Em seguida, as amostras foram vigorosamente agitadas com auxílio de um agitador vórtex e centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi submetido ao tratamento de amostra descrito no item 3.2.4.

3.2.3.5. Condições gerais de metabolismo *in vitro* via UGTs

Os ensaios investigativos iniciais para a otimização das condições de análise dos metabólitos formados via reações de glucuronidação foram inicialmente realizados pela ativação do HLMs. Os microsomas foram diluídos na solução tampão utilizada para a incubação; neste caso, a solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl_2 (5,0 mmol/L); e ativado pela adição de uma solução de alameticina (50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) dissolvida em metanol/água (50:50, v/v); a solução microsomal foi colocada em banho de gelo por 15 minutos e levemente agitada a cada 5 minutos.

Os ensaios de glucuronidação do montelukaste foram realizados em um eppendorf de 2,0 mL, onde adicionou-se montelukaste (0,05 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 25 μL de HLMs ativados (0,25 mg/mL) e 125 μL de solução tampão Tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl_2 (5,0 mmol/L). Após 5 min de pré-incubação à 37°C a reação foi iniciada pela adição de 100 μL da solução de UDGPA (5,0 mmol/L); com volume final de incubação de 250 μL . A reação foi realizada em um banho termostatizado à 37°C. Após o tempo de incubação desejado, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de acetonitrila e as amostras foram processadas de acordo com procedimento descrito no item 3.2.3.4.

3.2.3.6. Condições de metabolismo *in vitro* combinando os cofatores de CYPs e UGTs

Para a realização dos ensaios iniciais de metabolismo do montelukaste envolvendo simultaneamente as reações mediadas por CYPs e UGTs, seguiu-se o procedimento de incubação descrito para a glucuronidação do montelukaste (item 3.2.3.5). No entanto, a reação foi iniciada pela adição de 100 µL da solução de cofatores combinados (UDPGA (5,0 mmol/L) e sistema gerador de NADPH).

3.2.4. Tratamento das amostras

Após as incubações, as amostras foram submetidas a uma extração líquido-líquido, onde 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL, onde se adicionou 500 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio e 5,0 mL de MTBE. A mistura foi agitada vigorosamente por 30 s com auxílio de um agitador vortex e centrifugadas por 5 min a 36.000 rpm à 0°C (condição adaptada de BHARATHI et al., 2009¹⁷⁴). A fração orgânica foi removida e evaporada até à secura utilizando-se um sistema concentrador de amostras. O resíduo foi reconstituído com 80 µL de fase móvel constituída de acetonitrila/água acidificada (0,1% de ácido fórmico) (85:15, v/v) e 10 µL foi injetado no sistema de LC-MS.

3.2.4.1. Preparo da solução saturada de carbonato de sódio

A solução saturada de carbonato de sódio foi preparada pesando-se 11,9 g de carbonato de sódio e dissolvendo para um volume total de 40 mL de água, com auxílio de um sistema de ultrassom. Foi considerado uma constante de solubilidade de 29,78 g/100 g H₂O à 25°C.¹⁷⁵

3.2.5. Metabolismo *in vitro* do montelukaste via CYP P450s

Os estudos de metabolismo oxidativo do montelukaste mediado pelas enzimas do citocromo P450 foram realizados através da incubação do montelukaste (1,0 µmol/L) de acordo com o procedimento de condições gerais de metabolismo via CYP P450 descrito no item 3.2.3.4. A mistura de reação foi incubada por 30 min.

Também foram realizados experimentos controles, incluindo: a) incubação na ausência do sistema gerador de NADPH; b) na ausência de montelucaste; c) na ausência de fração microsomal e d) tempo zero min de incubação; onde os volumes foram compensados com solução tampão nos controles a, b e c. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.5.1. Determinação da linearidade de formação dos metabólitos

A linearidade de formação dos hidroximetabólitos do monteculaste foi determinada em relação ao tempo de incubação e concentração proteica. Montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado em HLMs (0,0 - 1,0 mg/mL) na presença do tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH7,4) e do sistema gerador de NADPH à 37°C, em um intervalo de tempo de 0-90 min.

3.2.5.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para o metabolismo oxidativo do montelucaste

Para determinar os parâmetros cinéticos de formação dos hidroximetabólitos do monteculaste, diferentes concentrações de montelucaste (0,05 – 15 $\mu\text{mol/L}$) foram incubadas por 30 min em duplicata e em dois lotes de HLMs (0,25 mg/mL) na presença do tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH7,4) e do sistema gerador de NADPH à 37°C. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o procedimento de condições gerais de metabolismo via CYP P450, descrito no item 3.2.3.4.

Para a quantificação dos metabólitos formados e determinação dos parâmetros cinéticos, curvas de calibração utilizando as soluções padrões do montelucaste e seus metabólitos foram preparadas. Para tal, soluções estoques de montelucaste, montelucaste sulfóxido, montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em metanol e diluídas para um intervalo de concentração de 0,001 – 0,25 $\mu\text{mol/L}$ (n=3), as quais foram utilizadas para construir as curvas de calibração. As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear considerando a razão entre a área da banda cromatográfica do metabólito e a área cromatográfica do padrão interno em cada concentração dos analitos. As curvas de calibração mostraram-se linear ($r^2 > 0,99$) na faixa de concentração avaliada. Como o padrão

analítico para o metabólito 25-OH montelucaste não estava disponível, a formação deste metabólito foi qualitativamente estimada utilizando a curva de calibração obtida para o montelucaste.

3.2.5.3. Análises de correlação em HLMs

Para determinar a correlação entre a atividade individual de uma isoforma de CYP P450 e a taxa de formação dos hidroximetabólitos do montelucaste, montelucaste (1,0 µmol/L) foi incubado em um painel de 14 HLMs caracterizados (9 doadores individuais e 5 pools), onde o conteúdo total de P450s, oxidoredutases e a atividade de cada isoforma foi determinada por reações de fenotipagem e fornecidas pelo fabricante (BD Gentest) (Apêndice A1).

As reações seletivas utilizadas para determinar a atividade das isoformas de CYPs foram: fenacetina O-deetilase (CYP1A2), cumarina 7-hidroxilase (CYP2A6), (S)-mefenitoína N-desmetilase (CYP2B6), paclitaxel 6α-hidroxilase (CYP2C8), diclofenaco 4'-hidroxilase (CYP2C9), (S)-mefenitoína 4'-hidroxilase (CYP2C19), bufuralol 1'-hidroxilase (CYP2D6), clorzoxazona 6-hidroxilase (CYP2E1), testosterona 6β-hidroxilase (CYP3A4) e ácido láurico 12-hidroxilase (CYP4A11). Montelucaste (1,0 µmol/L) foi incubado em triplicata com cada HLMs (0,25 mg/mL) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH7,4) e do sistema gerador de NADPH por 30 min à 37°C. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o procedimento de condições gerais de metabolismo via CYP P450 descrito no item 3.2.3.4.

3.2.5.4. Metabolismo do montelucaste em isoformas de CYPs

O metabolismo do montelucaste foi avaliado em um painel de 9 isoformas expressas humanas de CYPs (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP 3A5) para adicional caracterização das isoformas específicas envolvidas no seu metabolismo. Montelucaste (1,0 µmol/L e 0,02 µmol/L) foi incubado em triplicata com cada isoforma de CYP (20 pmol) utilizando as condições de incubação descritas no item 3.2.3.4.

Para as isoformas de CYPs que mostraram maior atividade em relação ao metabolismo do montelucaste e/ou que mostraram correlação com a formação dos

metabólitos na análise de correlação em HLMs (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP 4A11), estudos cinéticos foram realizados através da incubação de diferentes concentrações de montelukaste (0,05 – 15 $\mu\text{mol/L}$) onde foram incubadas por 30 min em duplicata com as isoformas de CYPs selecionadas (20 pmol) seguindo o procedimento de condições gerais de metabolismo via CYP P450 descrito no item 3.2.3.4.

3.2.5.5. Inibição química do metabolismo oxidativo do montelukaste

Para determinar a contribuição das CYPs no metabolismo do montelukaste, o efeito de inibidores químicos na velocidade de formação dos hidroximetabólitos do montelukaste em HLMs foram avaliados na ausência (controle) e na presença de inibidores seletivos das isoformas de CYPs. Montelukaste foi incubado com os seguintes inibidores: pilocarpina (50 $\mu\text{mol/L}$) para CYP2A6, tiotepa (50 $\mu\text{mol/L}$) para CYP2B6, quercetina (150 $\mu\text{mol/L}$) para CYP2C8, sulfafenazol (25 $\mu\text{mol/L}$) para CYP2C9, ticlopidina (5,0 $\mu\text{mol/L}$) para CYP2C19, quinidina (50 $\mu\text{mol/L}$) para CYP2D6, troleandomicina (50 $\mu\text{mol/L}$) e cetoconazol (1,0 $\mu\text{mol/L}$) para CYP3A4/5.

Os inibidores foram dissolvidos e diluídos em metanol para a concentração requerida, exceto ticlopidina e tiotepa que foram dissolvidos e diluídos em água. Todas as soluções foram estocadas a - 80°C, exceto as soluções preparadas em metanol as quais foram preparadas imediatamente antes de iniciar os ensaios de incubação.

As soluções dos inibidores e do montelukaste preparados em metanol foram evaporados até à secura utilizando um sistema concentrador de amostras antes da adição dos componentes de incubação. Os inibidores diluídos em água foram diretamente adicionados na mistura de incubação (25 μL) e esse volume foi compensado pela redução no volume de tampão adicionado (100 μL).

Inibidores competitivos (pilocarpina, tiotepa, quercetina, sulfafenazol, ticlopidina, quinidina e cetoconazol) foram pré-incubados por 5 min à 37°C com montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$ e 0,02 $\mu\text{mol/L}$), HLMs (0,25 mg/mL) e solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH7,4). A reação foi iniciada pela adição do sistema gerador de NADPH e após 30 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de acetonitrila e as amostras foram processadas de acordo com procedimento descrito no item 3.2.3.4.

O inibidor baseado em mecanismo enzimático (*Mechanism Based inhibitor*), troleandomicina, foi pré-incubado com HLMs (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH7,4) e sistema gerador de NADPH por 15 min à 37°C. Após a pré-incubação, o volume total (250 µL) foi transferido para um novo eppendorf contendo montelucaste (1,0 µmol/L) e evaporado, a fim de iniciar o metabolismo do montelucaste. A reação procedeu-se por 30 min e foi interrompida pela adição de 500 µL de acetonitrila. As amostras foram processadas de acordo com procedimento descrito no item 3.2.3.4.

3.2.6. Metabolismo *in vitro* do montelucaste via UGTs

Os estudos de glucuronidação direta do montelucaste foram realizados através da incubação do montelucaste (1,0 µmol/L), de acordo com o procedimento de condições gerais de metabolismo via UGTs descrito no item 3.2.3.5. No entanto, após 30 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de acetonitrila levando a precipitação proteica. Nevirapina (25 µL; 500 ng/mL em metanol) foi adicionado como padrão interno às amostras de incubação. Em seguida, as amostras foram vigorosamente agitadas com auxílio de um agitador vortex e centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. Na sequência, 300 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL, onde adicionou-se 500 µL de uma solução de HCl 0,1 mol/L e 5,0 mL de MTBE. A mistura foi agitada vigorosamente por 30 s com auxílio de um agitador vortex e centrifugadas por 5 min a 36.000 rpm à 0°C. A fração orgânica foi removida e evaporada até à secura utilizando um sistema concentrador de amostras. O resíduo foi reconstituído com 80 µL de fase móvel constituída de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (82:18, v/v) e 10 µL foi injetado no sistema de LC-MS.

Também foram realizados experimentos controles, incluindo: a) incubação na ausência do cofator UDPGA; b) na ausência de substrato (montelucaste); c) na ausência de fração microsomal e no d) tempo zero min de incubação; onde os volumes foram compensados com solução tampão nos controles a, b e c. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.6.1. Determinação da linearidade de formação dos glucuronídeos montelucaste

A linearidade de formação dos glucuronídeos do montelucaste foi determinada em relação ao tempo de incubação e concentração proteica. Montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado em HLMs (0,0-1,0 mg/mL) na presença do tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo cloreto de magnésio (5,0 mmol/L) e do cofator UDPGA (5,0 mmol/L) à 37°C, em uma faixa de tempo de 0-90 min.

3.2.6.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para glucuronidação do montelucaste

Para determinar os parâmetros cinéticos de formação dos glucuronídeos do monteculaste, diferentes concentrações de montelucaste (0,05 – 25 $\mu\text{mol/L}$) foram incubadas por 30 min em duplicata em dois lotes de HLMs (0,25 mg/mL) na presença da solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH7,4) contendo cloreto de magnésio (5,0 mmol/L) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) à 37°C. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o procedimento de condições de metabolismo do montelucaste via UGTs descrito no item 3.2.6.

Para estimar a quantidade de glucuronídeos formados na faixa de concentração analisada e assim determinar os parâmetros cinéticos, curvas de calibração utilizando as soluções padrões do montelucaste e montelucaste acil- β -D-glucuronídeo foram preparadas. Para tal, soluções estoques de montelucaste, montelucaste acil- β -D-glucuronídeo foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em metanol e diluídas para uma faixa de concentração de 0,01 – 1,0 $\mu\text{mol/L}$ (n=3), as quais foram utilizadas para construir as curvas de calibração. As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear considerando a razão entre a área da banda cromatográfica do metabólito e a área cromatográfica do padrão interno em cada concentração dos analitos. As curvas de calibração mostraram-se linear ($r^2 > 0,99$) na faixa de concentração avaliada. A formação do novo glucuronídeo do montelucaste identificado neste trabalho foi qualitativamente estimada utilizando a curva de calibração do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo.

3.2.6.3. Metabolismo do montelukaste em isoformas de UGTs

Para identificar as isoformas específicas de UGTs envolvidas na glucuronidação do montelukaste, o metabolismo do montelukaste via UGTs foi avaliado em um painel de 13 UGTs humanas expressas. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado em duplicata com cada UGT (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B15, UGT2B17) na concentração final de 0,025 mg/mL de proteína, na presença do tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH7,4) contendo cloreto de magnésio (5,0 mmol/L) e do cofator UDPGA (5,0 mmol/L) à 37°C. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o procedimento de condições de metabolismo do montelukaste via UGTs descrito no item 3.2.6. No entanto, em contraste com os experimentos em HLMs, a incubação em UGTs expressas dispensa a ativação através da adição de alameticina.⁶³ Como controle positivo e negativo, incubações com HLMs ativados foram realizadas em paralelo.

Entre as UGTs expressas avaliadas, a UGT1A3 mostrou maior atividade em relação ao metabolismo do montelukaste. Portanto, estudos cinéticos para a formação dos glucuronídeos do montelukaste foram realizados através da incubação em duplicata de diferentes concentrações do montelukaste (0,125 - 20 $\mu\text{mol/L}$) com a UGT1A3 (0,025 mg/mL) na presença da solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH7,4) contendo cloreto de magnésio (5,0 mmol/L) e do cofator UDPGA (5,0 mmol/L) à 37°C. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o procedimento adotado para o painel de UGTs descrito acima.

3.2.7. Tratamento e análise dos dados

Os parâmetros cinéticos aparentes, velocidade máxima de formação (V_{max}) e concentração do substrato resultando em 50% do V_{max} (K_m), para os hidroximetabólitos e glucuronídeos do montelukaste foram estimados através da equação de cinética enzimática de Michaelis-Menten ($V = V_{\text{max}} \times [S]/(K_m + [S])$) utilizando análises de regressão não linear. O *clearance* intrínseco aparente (Cl_{int}) *in vitro* foi calculado através da razão V_{max}/K_m . A percentagem de inibição da taxa de formação dos metabólitos por inibidores específicos de isoformas de P450 foi calculada através da comparação da atividade enzimática na ausência (controle) e na

presença de inibidores. A análise de correlação foi realizada através de análises de regressão não paramétrica, utilizando o teste de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram apresentados com a média \pm SD ou como a média de duplicatas experimentais. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Influência das condições de incubação no metabolismo do montelucaste via CYPs e UGTs

Condições experimentais de incubação *in vitro* de fármacos são bem descritas na literatura e sabe-se que diferentes fatores afetam a atividade enzimática, incluindo: o tipo, a concentração salina e o pH da solução tampão de incubação e a concentração de alameticona e o uso de sacarolactona nos ensaios de UGTs. Estas variáveis de incubação podem influenciar diferentemente na atividade das enzimas UGTs e CYPs e, conseqüentemente, na determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e Cl_{int}) em estudos de metabolismo *in vitro*.^{32,33,176-178}

Convencionalmente os parâmetros cinéticos são determinados através do monitoramento da velocidade de formação dos metabólitos em uma curva de concentração-resposta. Alternativamente, a abordagem de decaimento da concentração do substrato pode ser utilizada para se determinar o K_m de uma reação enzimática em situações em que o monitoramento da formação do metabólito é inviável, principalmente devido à falta de padrões analíticos autênticos para se quantificar/estimar a formação do metabólito. Nesses casos, o valor de K_m pode ser obtido utilizando a equação proposta por OBACH e REED-HAGEN (2002).¹⁷⁹ Adicionalmente, a abordagem de decaimento do substrato tem sido utilizada para estimar a contribuição da via enzimática no *clearance* do fármaco através de experimentos combinando os cofatores de UGTs e P450s, onde o *clearance* intrínseco (Cl_{int}) é determinado baseando-se na equação proposta por HOUSTON (1994)¹⁸⁰ e OBACH (1999)⁹³ utilizando a meia-vida *in vitro* ($t_{1/2}$) do fármaco a partir do decaimento do substrato em uma única concentração.^{61,173,181}

Baseando-se nestas informações, a primeira etapa deste trabalho foi avaliar a condição de incubação mais adequada para estimar a contribuição das enzimas do citocromo P450 (CYPs) e UDP-glucuronosil transferases (UGTs) no Cl_{int} *in vitro* do montelukaste e assim estimar a principal rota metabólica envolvida na sua eliminação. Para tanto, utilizou-se das abordagens de decaimento de substrato e de experimentos combinando os cofatores de UGTs e P450s, onde quatro condições de incubação foram avaliadas de acordo com a Tabela 3.1.

A Figura 3.3 ilustra os percentuais de decaimento do montelukaste obtidos através das reações mediadas por CYPs, UGTs e combinando ambas as vias (CYPs + UGTs), em cada condição de incubação avaliada. Comparando os resultados obtidos a partir das condições I (Figura 3.3a) e II (Figura 3.3b) foi observado que a porcentagem de decaimento do montelukaste obtido via P450s reduziu cerca de 30,0% com a mudança da solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L (decaimento do substrato de 57,0%) para a solução tampão tris-HCl (decaimento do substrato de 27,0%). As condições I e III se diferem na concentração da solução tampão fosfato de sódio e pode-se observar que a menor concentração da solução tampão aumenta o decaimento da concentração do montelukaste via P450s em cerca de 21,0%. Comparando as condições III e IV, as quais diferem pela presença de sacarolactona na condição IV, foi observada uma redução de 19,0% no decaimento do montelukaste via P450s, demonstrando que a presença da sacarolactona diminui a atividade das CYPs em relação ao metabolismo do montelukaste. Resumidamente, com as quatro condições de incubação avaliadas, foi possível observar que a condição III foi a que se mostrou mais favorável para a atividade das enzimas CYP P450s, podendo-se assim concluir que a solução tampão fosfato de sódio aumenta a atividade das CYPs, a qual também é favorecida por baixas concentrações da solução tampão.

Este efeito das soluções tampão foi também previamente observado e reportado na literatura, onde YAMAZAKI et al. (1995)¹⁸² indicaram que a isoforma CYP3A4 mostrou maior atividade em reações de oxidação da nifedipina em presença da solução tampão fosfato do que em solução tampão tris-HCl. Ainda, MÄENPÄÄ et al. (1998)¹⁷⁸ mostrou que a taxa de metabolismo oxidativo do midazolam em HLMs foi maior em solução tampão fosfato do que em solução tampão tris-HCl, quando as mesmas concentrações da solução tampão foram estudadas.

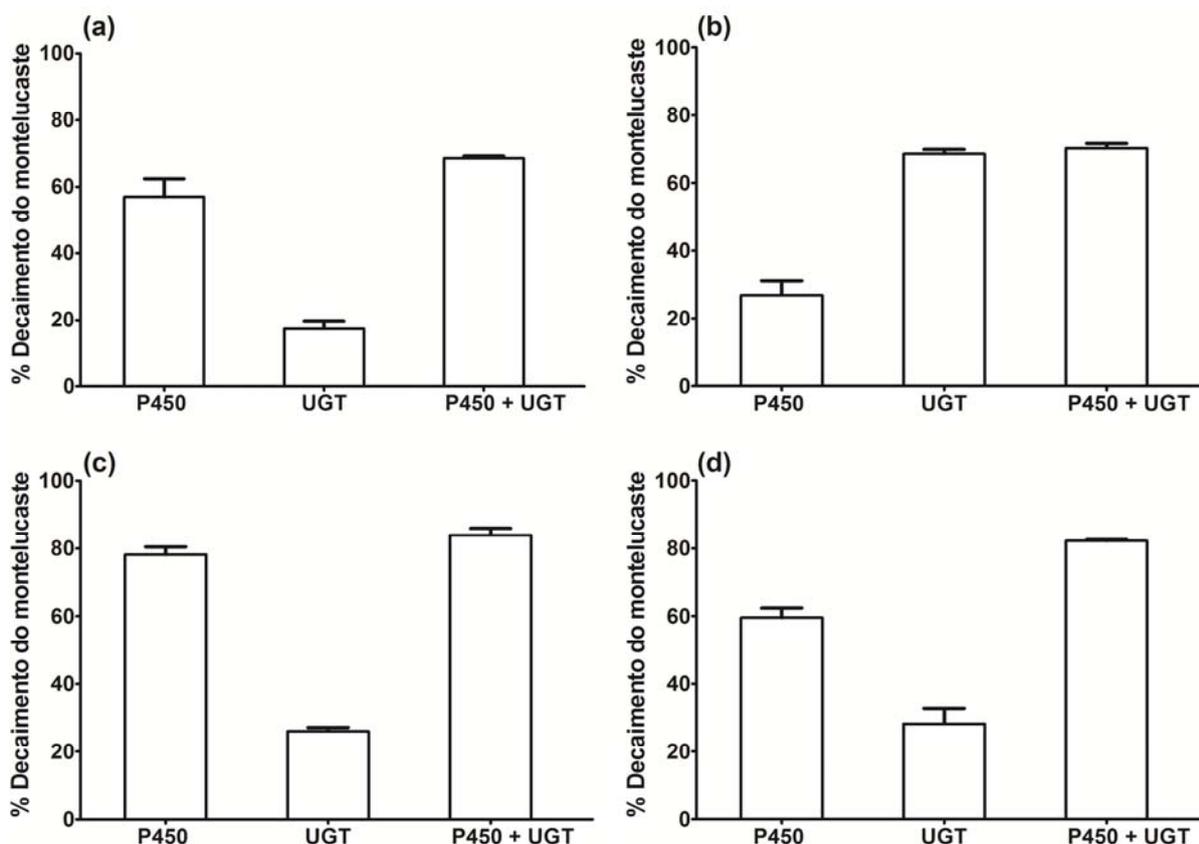


FIGURA 3.3 – Percentual de decaimento da concentração do montelucaste obtidos através das reações mediadas por CYPs, UGTs e pela combinação de ambas vias (CYPs + UGTs). (a) Condição I: para P450s: Solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4); para UGTs e combinado (P450 + UGT): Solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) contendo $MgCl_2$ (3,4 mmol/L), EDTA (1,15 mmol/L) e sacarolactona (115 μ mol/L) (adaptado de KILFORD et al., 2009¹⁷³); (b) Condição II: Solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo $MgCl_2$ (5,0 mmol/L) (adaptado de WALSKY et al., 2012⁶³); (c) Condição III: Solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo $MgCl_2$ (3,3 mmol/L); (d) Condição IV: Solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo $MgCl_2$ (1,0 mmol/L) e sacarolactona (5,0 mmol/L) (adaptado de FISHER et al., 2000⁶¹). Montelucaste (0,05 μ mol/L) foi incubado com HLMs (0,25 mg/mL) nas respectivas condições por 90 min a 37 °C.

Considerando-se o decaimento do montelucaste via UGTs, a mudança da condição I para a condição II aumentou em 4,0 vezes o percentual de decaimento do substrato. Este aumento na glucuronidação do montelucaste pode ser devido à influência da presença do EDTA, sacarolactona e do tipo de solução tampão, na atividade das enzimas UGT. Comparando as condições experimentais III e IV,

ambas envolvendo a solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L) e diferindo pela presença de sacarolactona, um inibidor de β -glucuronidase,⁶³ foi observado que os percentuais de decaimento foram similares com uma diferença estatisticamente não significativa ($p > 0,05$). Adicionalmente, comparando as condições I e III, as quais se diferem pela concentração da solução tampão fosfato de sódio, foi observado que os percentuais de decaimento do montelucaste via UGTs não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) nas concentrações avaliadas de solução tampão fosfato de sódio. Deste modo, concluiu-se que o tipo de solução tampão foi a variável de maior influência na atividade das enzimas UGTs relacionadas à glucuronidação do montelucaste, uma vez que a solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L) aumentou significativamente o decaimento da concentração do montelucaste. Portanto, a condição II foi a condição mais favorável para a glucuronidação do montelucaste e atividade das UGTs. Este fato também foi observado por BOASE e MINERS (2002),¹⁷⁷ os quais demonstraram que a glucuronidação da zidovudina em solução tampão tris-HCl mostrou maior V_{max} quando comparado à solução tampão fosfato. Adicionalmente, WASLKY et al. (2012)⁶³ demonstrou que a solução tampão tris-HCl relativamente à solução tampão fosfato aumenta a atividade das enzimas UGT1A4 e UGT1A9 em HLMs e das enzimas recombinantes UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9 e UGT2B7.

Com intuito de avaliar o efeito da concentração de alameticina na glucuronidação do montelucaste, foram realizadas incubações ativando os microsomas com concentrações de alameticina 0 - 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, utilizando a condição II de incubação, a qual foi a condição mais favorável para a glucuronidação do montelucaste (Figura 3.4a). Relativamente às amostras incubadas com microsomas não ativados (na ausência de alameticina), a alameticina aumenta o percentual do decaimento da concentração do montelucaste em 3,7%, 47,7% e 45,3% quando foi utilizado as concentrações de 10, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, respectivamente. Assim, esses resultados demonstram que a alameticina aumenta a glucuronidação do montelucaste em 3,0 vezes na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína. Adicionalmente, foi observado que concentrações mais elevadas de alameticina não aumentaram a atividade das UGTs nas condições de incubação avaliada, uma vez que não foi observado aumento no percentual de decaimento quando a concentração de alameticina foi aumentada de 25 para 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína. Portanto, pode-se observar que a alameticina favorece consideravelmente a

atividade das UGTs envolvidas na glucuronidação do montelucaste e que este efeito é dependente da concentração.

Do mesmo modo, FISHER et al. (2000)⁶¹ demonstraram que a presença da alameticina resulta em um aumento nas velocidades de glucuronidação em comparação com microsomas não tratados. Ainda, WALSKY et al. (2012)⁶³ sugeriu que a concentração ideal de alameticina para obter a máxima ativação é dependente da concentração proteica, e indicou que uma maior razão alameticina/proteína é requerida para a ativação de UGTs em baixas concentrações proteicas.

O efeito da alameticina na atividade das CYPs também foi avaliado empregando-se a condição I (mais favorável para a atividade das CYPs). Para tanto, montelucaste foi incubado na ausência e na presença de alameticina 50 µg/mg proteína. Os resultados (Figura 3.4b) mostraram que alameticina não tem nenhum efeito no metabolismo do montelucaste via CYP P450. Esta observação está de acordo com o relato de FISHER et al. (2000)⁶¹, o qual mostrou que alameticina não afeta significativamente a atividade das CYP3A4/5.

Com relação à presença da sacarolactona no meio de incubação, não foi observado nenhuma influência no decaimento da concentração do montelucaste via UGTs. O que está de acordo com relatos na literatura indicando o efeito inibitório (por exemplo, UGT1A4 e UGT1A9) ou benefícios limitados da presença da sacarolactona na atividade das UGTs.^{58,63,183} Em contraste, a presença da sacarolactona reduziu a atividade das CYP P450 em relação ao metabolismo do montelucaste. A sacarolactona é um inibidor da β-glucuronidase e é frequentemente adicionada a misturas reacionais de glucuronidação para minimizar a hidrólise dos glucuronídeos pelas β-glucuronidases endógenas.^{58,63} A sacarolactona tende a diminuir o pH do meio de incubação, o que pode potencialmente alterar a atividade de UGTs e CYP P450s. Assim, a menos que exista evidência de que a fonte de enzimas possui atividade β-glucuronidase, o que comumente resulta na degradação dos glucuronídeos de interesse, a inclusão da sacarolactona no meio de incubação é dispensável.⁸⁷

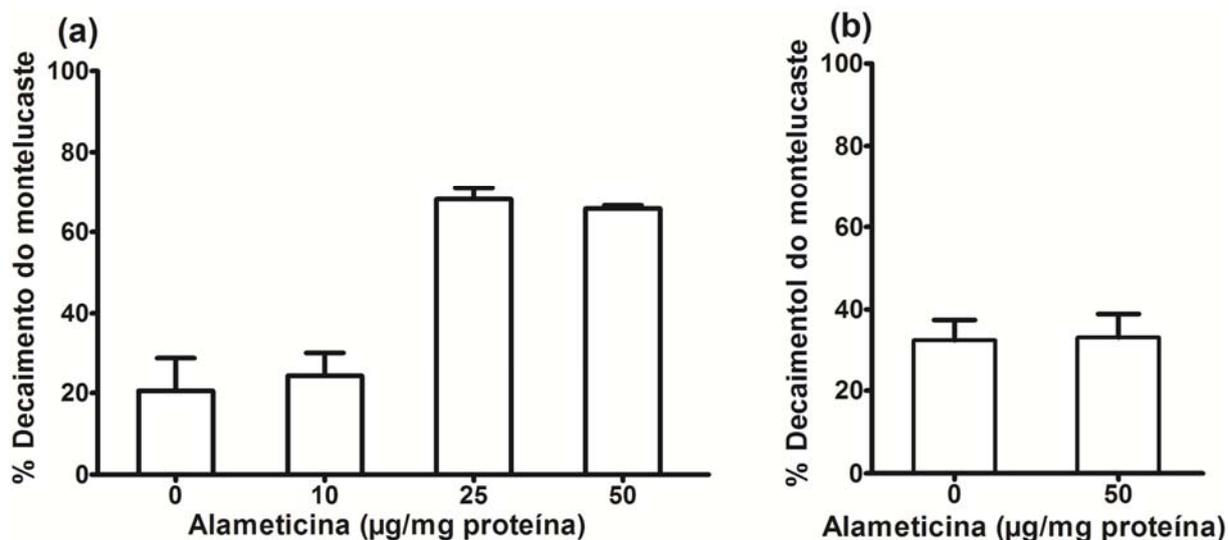


FIGURA 3.4 – Efeitos da concentração de alameticina no percentual de decaimento da concentração do montelucaste. (a) via glucuronidação. Montelucaste (0,05 µmol/L) foi incubado na presença de HLMS ativado (0,025 mg/mL) com alameticina (0 - 50 µg/mg proteína), solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L, pH 7,4) contendo MgCl₂ (5,0 mmol/L) e do cofator UDPGA (5,0 mmol/L) (volume total de 250 µL) por 90 min a 37 °C. (b) via CYP P450. Montelucaste (0,05 µmol/L) foi incubado na presença de HLMS ativado (0,025 mg/mL) com alameticina (0 e 50 µg/mg proteína), da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e do sistema gerador de NADPH (volume total de 250 µL) por 90 min a 37 °C.

As condições II e III demonstraram ser as condições de incubação mais favoráveis para as reações catalisadas por UGTs e P450s, respectivamente. No entanto, não foi encontrado no presente estudo uma condição de incubação ótima para as enzimas UGTs e P450s simultaneamente. Em relação à abordagem de cofatores combinados foi observado um decaimento da concentração do montelucaste similar e estatisticamente não diferente ($p > 0,05$) nas quatro condições avaliadas, o que pode ser justificado pelo fato de que a condição que favorece a glucuronidação do montelucaste desfavorece o metabolismo oxidativo e vice-versa. O mecanismo do efeito ou impacto da solução tampão não é completamente claro, embora alguns estudos indiquem que este efeito é substrato dependente e também é relativo à principal enzima envolvida na reação metabólica específica.^{32,33,184}

A abordagem de cofatores combinados (UGT +P450) tem sido indicada como uma alternativa para estimar o *clearance in vitro* total e a contribuição individual da via metabólica, UGTs e P450s, no *clearance in vitro* total.^{61,173,181} Entretanto, esta metodologia pode gerar resultados errôneos, devido as diferentes influências das

condições de incubação na atividade dessas enzimas. No presente estudo observou-se que o tipo da solução tampão (fosfato de sódio ou tris-HCl) foi a variável de maior influência na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do montelucaste e, portanto, que as soluções tampão fosfato de sódio e tris-HCl mostraram ser os mais adequados para alcançar a máxima atividade catalítica das CYPs e UGTs, respectivamente.

Segundo KILFORD et al. (2009)¹⁷³ o *clearance* intrínseco total utilizando-se os cofatores combinados é comparável à soma dos Cl_{int} individuais das UGTs e P450s. No entanto, este efeito não foi observado para o decaimento da concentração do montelucaste, pois a condição de incubação utilizada favoreceu majoritariamente uma das vias metabólicas, onde o percentual de decaimento via cofatores combinados foi aproximadamente o do percentual de decaimento da via metabólica favorecida pela condição de incubação. KILFORD et al. (2009)¹⁷³ reportou também que os fármacos naloxona, raloxifeno e zidovudina mostram ser metabolizados via P450 e UGTs. No entanto, de acordo com estudos sistemáticos e específicos de metabolismo, estes fármacos alvos são metabolizados unicamente via reações de glucuronidação.^{185,186} Está divergência entre os estudos de KILFORD et al. (2009) e a literatura pode ser devido ao uso de condições inapropriadas de incubação para o estudo destes fármacos. Adicionalmente, nos estudos de KILFORD et al. (2009) foi utilizada solução tampão fosfato nos ensaios de incubação, o que de acordo com o presente estudo e outros relatos na literatura^{178,182} favorece a atividade das P450s, e pode explicar o decaimento da naloxona, raloxifeno e zidovudina via CYP P450s.

Deste modo, os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o uso da abordagem de cofatores combinados para estimar o *clearance* total ou a contribuição individual da via metabólica no *clearance* total de um fármaco deve ser cuidadosamente aplicada, pois a escolha da solução tampão e a presença de outros constituintes do meio de incubação (não avaliados no presente estudo) podem gerar resultados errôneos. Conseqüentemente, a abordagem de cofatores combinados demonstrou não ser apropriada para avaliar a contribuição das vias metabólicas, P450s e UGTs, no *clearance* intrínseco total do montelucaste.

Assim, para alcançar a proposta de estimar e avaliar a contribuição das vias metabólicas, P450s e UGTs, no *clearance* intrínseco total do montelucaste, foi utilizada a abordagem convencional de determinação dos parâmetros cinéticos

através do monitoramento da velocidade de formação dos metabólitos em uma curva de concentração-resposta.

3.3.2. Metabolismo *in vitro* do montelucaste via CYP P450s

Com intuito de reavaliar as CYP específicas envolvidas no metabolismo oxidativo do montelucaste, estudos de fenotipagem enzimática foram realizados utilizando as condições de incubação anteriormente otimizadas.

Inicialmente, foi conduzido o desenvolvimento analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para a análise de montelucaste e seus hidroximetabólitos em frações microssomais. Durante o desenvolvimento das condições cromatográficas diferentes composições de fase móvel foram avaliadas para otimizar a separação analítica em uma coluna Luna C18 (100 mm x 2,0 mm id; 3 μ m, Phenomenex), incluindo o uso de metanol e acetonitrila como modificador orgânico e água acidificada com ácido fórmico, solução tampão formiato de amônio (5,0 e 10 mmol/L) ou solução tampão acetato de amônio (5,0 e 10 mmol/L) em diferentes valores de pH, como fase aquosa. Dentre as condições avaliadas, a melhor condição para a análise cromatográfica dos compostos de interesse foi alcançada fazendo-se uso de acetonitrila e água acidificada (0,1% de ácido fórmico), a qual resultou em um tempo total de análise de 5 min. As condições cromatográficas otimizadas estão descritas no item 3.2.2.

Nas análises exploratórias iniciais do metabolismo oxidativo do montelucaste foi possível observar a formação dos metabólitos montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste, 25-OH montelucaste e montelucaste sulfóxido. O metabólito α -hidroximetontelucaste não pode ser monitorado pelo método de LC-MS/MS adotado devido a sua baixa sensibilidade para este composto. A Figura 3.5 ilustra o perfil cromatográfico obtido por LC-MS para o montelucaste e seus hidroximetabólitos.

Como reportado previamente (FILPPULA et al., 2011)¹⁶⁸, o metabólito montelucaste sulfóxido estava presente como um contaminante no padrão analítico do montelucaste, dificultando a quantificação exata deste metabólito e, conseqüentemente, impossibilitando identificar precisamente as CYPs responsáveis pela sua formação.

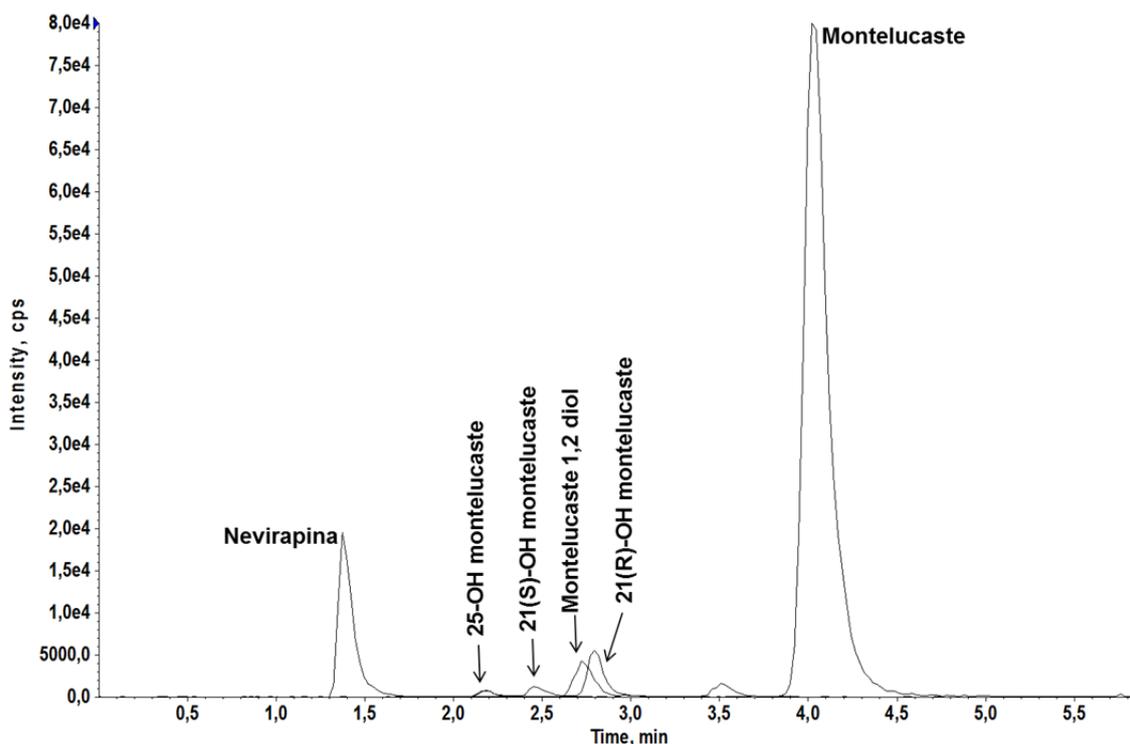


FIGURA 3.5 – Cromatograma representativo do perfil de separação obtido por LC-MS/MS no modo SRM para montelukaste e seus hidroxí-metabólitos provenientes da incubação de montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) em solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4), HLMs (0,25 mg/mL) e sistema regenerador de NADPH por 30 min à 37 °C. Coluna Luna C18 (100 x 2,0 mm; 3 μm); fase móvel: acetonitrila/água acidificada (0,1% de ácido fórmico) 85:15 (v/v); vazão de 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 μL . As transições monitoradas estão descritas na Tabela 3.1.

3.3.2.1. Determinação da linearidade de formação dos hidroxí-metabólitos do montelukaste

Os experimentos exploratórios demonstraram que a formação dos hidroxí-metabólitos do montelukaste foi dependente do tempo de incubação, concentração proteica, concentração do montelukaste e da presença do sistema gerador de NADPH. As condições de linearidade para a formação dos hidroxí-metabólitos provenientes da incubação do montelukaste foram estabelecidas como 30 min e 0,25 mg/mL em relação ao tempo de incubação e concentração proteica, respectivamente. Esses valores foram determinados através de valores em uma região linear das curvas de tempo de incubação e concentração proteica *versus* formação dos metabólitos, a qual também resultou em uma boa sensibilidade para todos os metabólitos nas condições de análise por LC-MS/MS adotadas.

As condições de linearidade são aplicadas aos experimentos de fenotipagem e experimentos de concentração-resposta, para obtenção dos parâmetros cinéticos; de modo a garantir: i) a formação linear dos metabólitos em relação ao tempo; ii) atividade máxima das enzimas, a qual diminui ao longo do tempo na presença do meio reacional; e iii) a concentração enzimática adequada nos ensaios, evitando que outros processos, como ligações inespecíficas, não alterem o perfil de saturação das enzimas e, assim, os parâmetros cinéticos. A Figura 3.6 ilustra os resultados obtidos para os ensaios de determinação de linearidade de formação dos hidróxi-metabólitos do montelucaste.

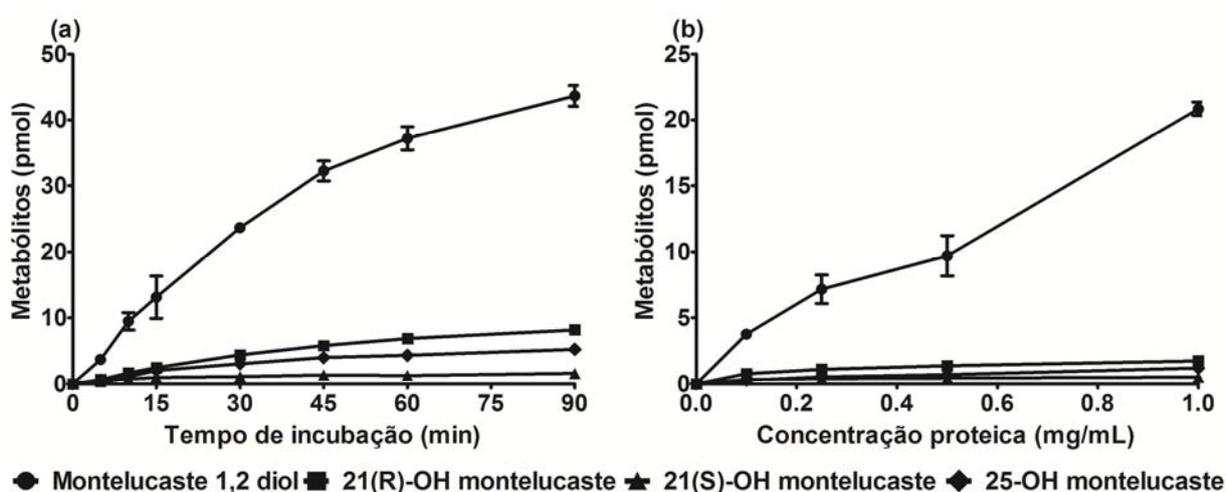


FIGURA 3.6 – Gráficos representativos da linearidade de formação dos hidróxi-metabólitos do montelucaste. (a) Curva de tempo de incubação x formação de metabólito. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado em solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4), HLMs (0,25 mg/mL) e sistema regenerador de NADPH à 37 °C. A reação foi terminada em 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 min de incubação. (b) Curva de concentração proteica x formação de metabólito. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado em solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4), HLMs (0,0 – 1,0 mg/mL) e sistema regenerador de NADPH por 30 min à 37 °C.

3.3.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para o metabolismo oxidativo do montelucaste

As análises cinéticas do metabolismo oxidativo do montelucaste foram realizadas em duas diferentes preparações de HLMs. As taxas de formação dos metabólitos na curva de concentração-reposta foram caracterizadas por uma curva de saturação hiperbólica e a cinética foi bem descrita pela equação de Michaelis-

Menten. Os perfis cinéticos do metabolismo do montelukaste para os metabólitos montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste em ambas as preparações de HLMs estão ilustrados na Figura 3.7. A Tabela 3.3 resume os parâmetros cinéticos obtidos para os quatro hidroximetabólitos do montelukaste.

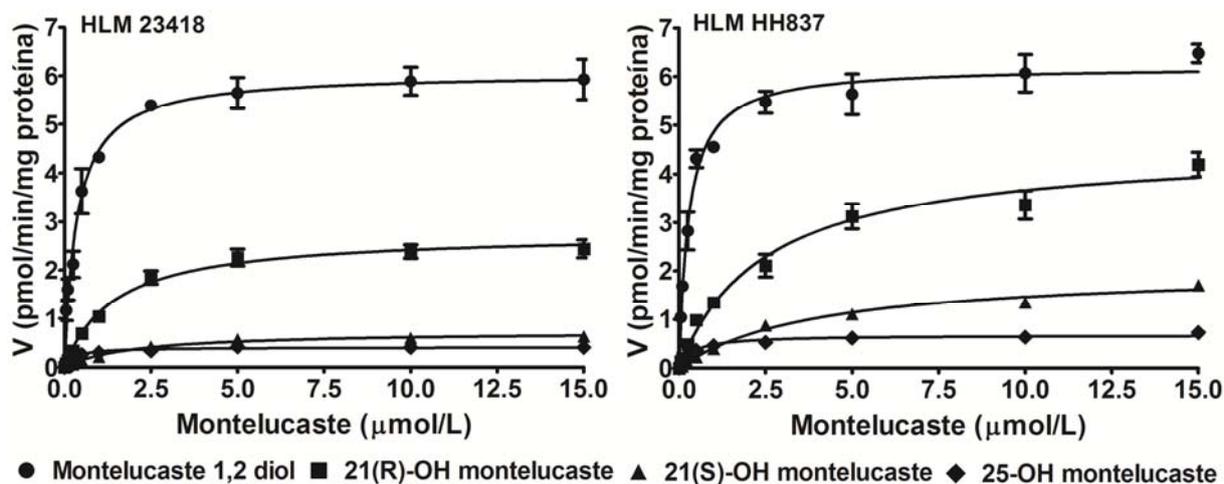


FIGURA 3.7 – Perfil cinético representativo do metabolismo do montelukaste em dois HLMs. Concentrações crescentes de montelukaste (0-15 $\mu\text{mol/L}$) foram incubadas com HLMs (0,25 mg/mL) e sistema gerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações.

TABELA 3.3 - Parâmetros cinéticos para a formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste a partir do metabolismo oxidativo do montelukaste em dois HLMs

Metabólitos	HLM (HH837)			HLM (23418)		
	V_{\max}	K_m	Cl_{int}	V_{\max}	K_m	Cl_{int}
Montelukaste 1,2 diol	6,21	0,28	22,27	6,06	0,35	17,02
21(R)-OH montelukaste	4,58	2,49	1,84	2,77	1,46	1,89
21(S)-OH montelukaste	2,04	3,94	0,52	0,74	2,01	0,37
25-OH montelukaste	0,67	0,40	1,68	0,41	0,27	0,37

Os parâmetros cinéticos para a formação dos metabólitos oxidativos do montelukaste foram estimados através da equação de Michaelis-Menten.

V_{\max} : pmol/min/mg proteína; K_m : $\mu\text{mol/L}$; Cl_{int} : $\mu\text{L/min/mg}$ proteína

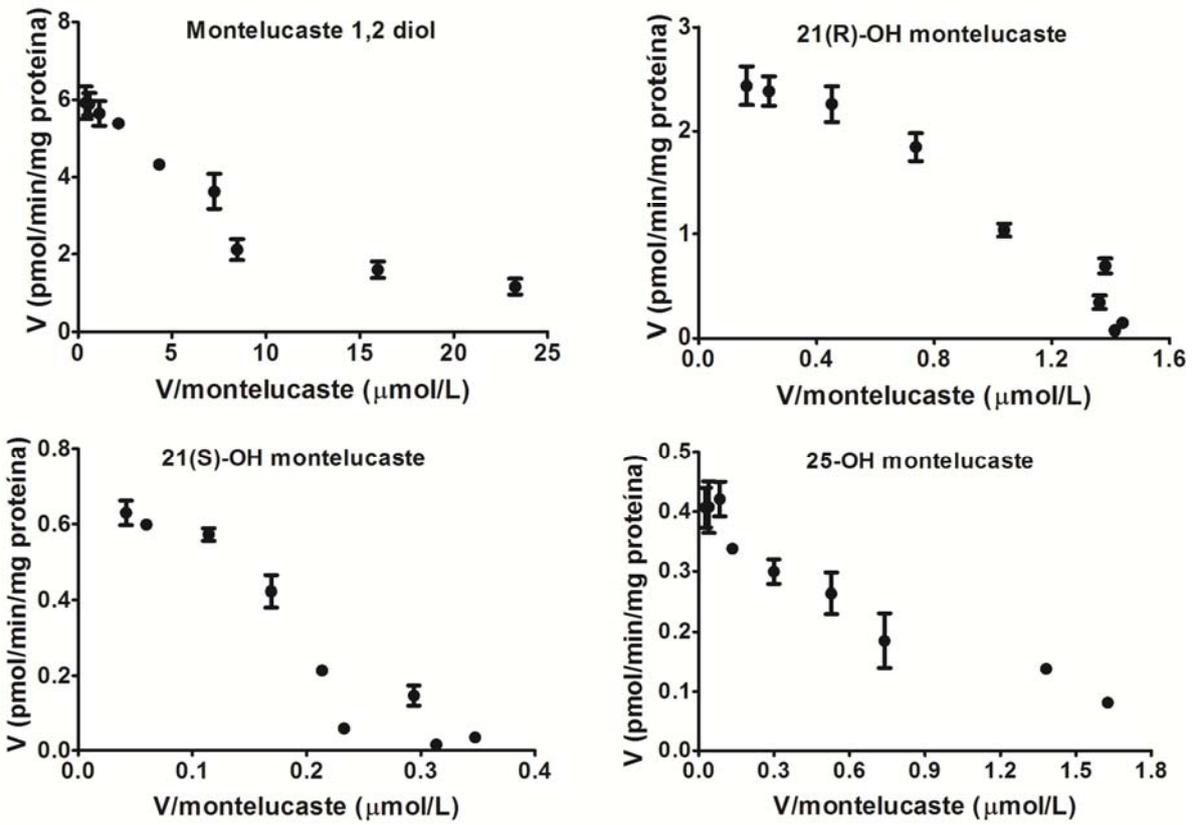
Baseando-se nos valores obtidos para o Cl_{int} *in vitro* total, calculado através da soma do Cl_{int} de todos os hidroximetabólitos e considerando os valores médios dos dois HLMs utilizados, o Cl_{int} referente à formação do montelukaste 1,2 diol

representa 83,5% do Cl_{int} total do metabolismo oxidativo do montelucaste. Os metabólitos 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste representam 16,5% do Cl_{int} total, o que sugere que o metabólito montelucaste 1,2 diol é o metabólito majoritário. Entre os metabólitos minoritários, o 21(R)-OH montelucaste representa o segundo maior percentual do Cl_{int} total (7,9%), seguido pelo 25-OH montelucaste (6,7%) e 21(S)-OH montelucaste (1,9%). Estes resultados estão de acordo com outros estudos *in vitro*^{168,169,171} e *in vivo*¹⁷¹ reportados na literatura. No entanto, ainda de acordo com a literatura, montelucaste 1,2 diol sofre metabolismo secundário levando à formação do ácido dicarboxílico montelucaste (M4) *in vivo*^{159,170} e *in vitro*.¹⁶⁸ Assim, como os nossos experimentos não incluem o metabolismo secundário, podemos esperar que a contribuição do montelucaste 1,2 diol no Cl_{int} total do metabolismo oxidativo do montelucaste seja ligeiramente menor que 83,5%.

Antes do advento das modernas tecnologias computacionais, a linearização da equação de Michaelis-Menten foi bastante utilizada nos estudos de metabolismo de fármacos para estimativa dos parâmetros V_{max} e K_m , por exemplo, pelo gráfico de Eadie-Hofstee, o qual relaciona velocidade de formação dos metabólitos *versus* a razão velocidade/concentração do substrato ($v/[S]$). Nesta transformação a inclinação da reta e o intercepto no eixo y correspondem ao $-K_m$ e V_{max} , respectivamente. Atualmente com a disponibilidade de inúmeros softwares, as análises de regressão não linear são recomendadas para se obter os parâmetros cinéticos. No entanto, a linearização dos dados também é útil para avaliar a tendência dos dados e, assim, inferir a participação de múltiplas enzimas na catálise de uma mesma reação enzimática. Entretanto, a interpretação dos gráficos de Eadie-Hofstee não é trivial, uma vez que as curvas obtidas usualmente não são bem definidas.¹⁸⁷

Nesse trabalho, os gráficos de Eadie-Hofstee foram obtidos para o montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo oxidativo do montelucaste em dois HLMs e estes estão ilustrados na Figura 3.8. Através dos resultados pode-se observar uma relação linear entre a velocidade de formação e a razão velocidade/concentração de montelucaste, indicando a ausência de cooperatividade entre enzimas e o envolvimento de apenas uma enzima na formação destes metabólitos ou mais de uma enzima com afinidades similares.

HLM 23418



HLM HH837

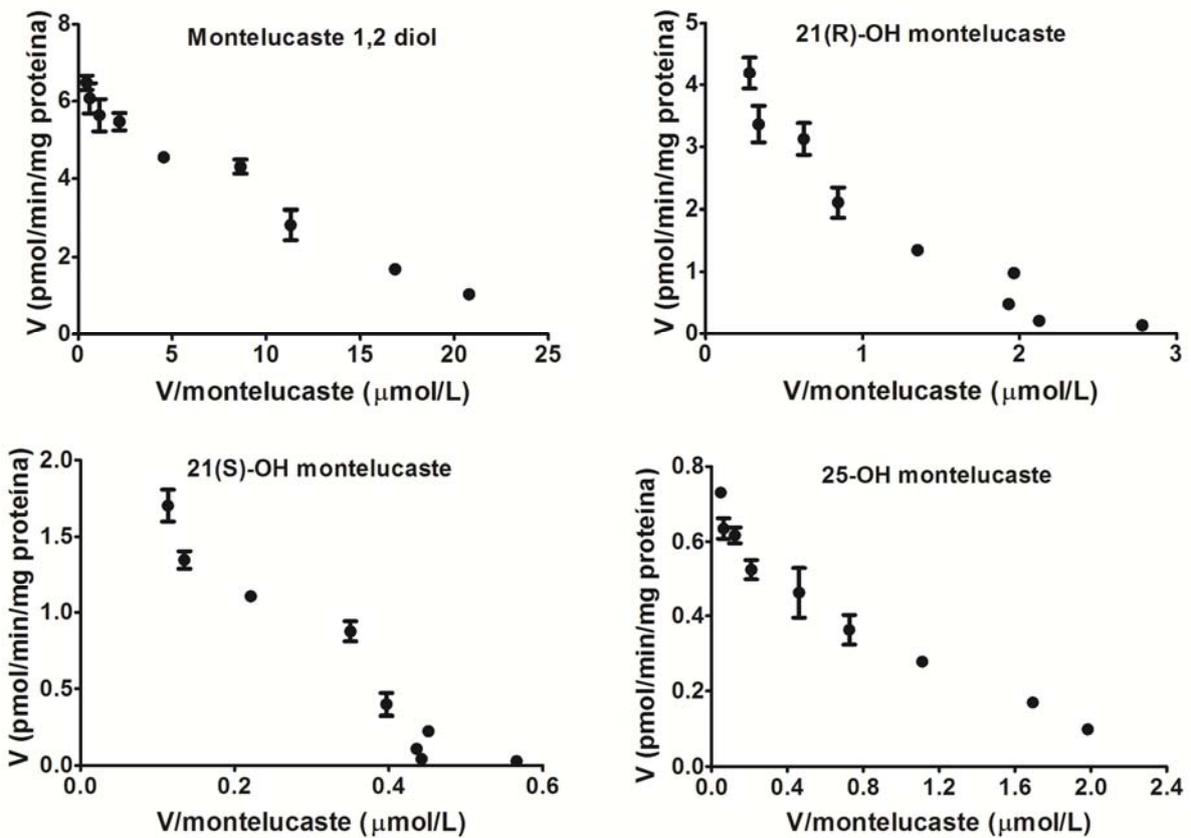


FIGURA 3.8 – Gráficos de Eadie-Hofstee para o metabolismo oxidativo do montelukaste em dois HLMs.

3.3.2.3. Análises de correlação em HLMs

Os resultados de correlação entre a velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo do montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) e as atividades de diferentes isoformas de P450s e conteúdo total de P450s em 14 HLMs estão resumidas na Tabela 3.4 e ilustradas na Figura 3.9.

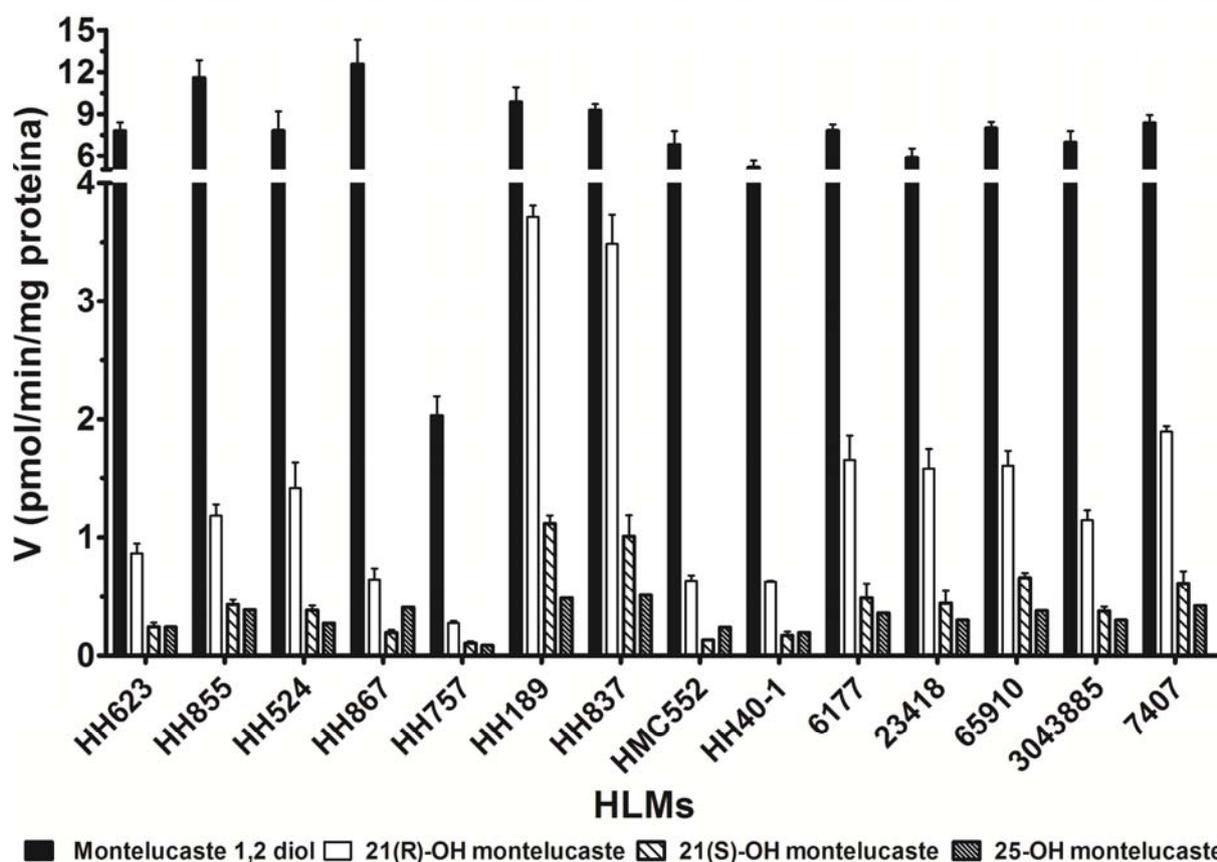


FIGURA 3.9 – Velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste em um painel de 14 HLMs caracterizados. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com HLMs (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema gerador de NADPH por 30 min a 37 °C.

A velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol correlacionou-se significativamente ($p < 0,05$) com a atividade da CYP2C8, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11. As velocidades de formação dos metabólitos 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste mostraram correlação com a atividade da CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19 e CYP3A4. Já a velocidade de formação do 25-OH

montelucaste correlacionou-se significativamente com a atividade da CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11. Como observado na Tabela 3.4 todos os metabólitos mostraram uma boa correlação com a atividade da CYP2C19 ($r > 0,81$ e $p < 0,0004$) e CYP3A4 ($r > 0,68$ e $p < 0,007$). A correlação entre os hidroximetabólitos do montelucaste (exceto 25-OH montelucaste) com as demais enzimas, incluindo as P450s totais, não foi significativa ($r < 0,5$; $p > 0,05$).

As velocidades médias de formação \pm S.D. (pmol/mim/mg proteína) do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo oxidativo do montelucaste em uma panel de 14 HLMs (Figura 3.9) foram $7,86 \pm 2,62$ (faixa de 2,03 – 12,6), $1,48 \pm 1,016$ (faixa de 0,276 – 3,71), $0,456 \pm 0,309$ (faixa de 0,106 – 1,12), $0,3294 \pm 0,117$ (faixa de 0,0875 – 0,513), respectivamente.

TABELA 3.4 - Correlação da velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo do montelucaste (1,0 μ mol/L) com as atividades de diferentes isoformas de P450s e conteúdo total de P450s em 14 HLMs

P450s	Montelucaste 1,2 diol		21(R)-OH montelucaste		21(S)-OH montelucaste		25-OH montelucaste	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Total P450	0,47	0,091	0,46	0,094	0,46	0,094	0,65	0,012
Citocromo c	0,02	0,935	0,18	0,542	0,15	0,604	0,06	0,852
Citocromo b5	-0,09	0,770	-0,23	0,430	-0,24	0,403	-0,28	0,336
CYP1A2	0,21	0,473	-0,01	0,970	-0,08	0,794	0,15	0,604
CYP2A6	0,30	0,302	0,84	0,0002	0,78	0,001	0,68	0,008
CYP2B6	0,48	0,080	0,61	0,020	0,59	0,027	0,65	0,012
CYP2C8	0,63	0,016	0,33	0,246	0,33	0,253	0,60	0,025
CYP2C9	0,37	0,190	0,17	0,562	0,15	0,609	0,30	0,291
CYP2C19	0,82	0,0004	0,84	0,0002	0,84	0,0001	0,94	<0,0001
CYP2D6	0,34	0,239	0,28	0,337	0,35	0,220	0,32	0,259
CYP2E1	0,50	0,066	0,05	0,863	0,01	0,976	0,27	0,357
CYP3A4	0,68	0,007	0,85	0,0001	0,81	0,0004	0,78	0,001
CYP4A11	0,81	0,0004	0,29	0,323	0,33	0,253	0,61	0,020
FMO	0,12	0,689	-0,07	0,815	-0,04	0,886	0,06	0,839

Os dados foram analisados utilizando o teste de Spearman (*r*). $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Quanto mais próximo de 1 o valor de *r*, mais significativo é a correlação.

Os resultados a partir das análises de correlação mostrou o envolvimento de muitas isoformas de CYPs no metabolismo oxidativo do montelucaste e não forneceu informações muito claras sobre as principais enzimas envolvidas que catalisam a formação dos hidroximetabólitos. Isto provavelmente é resultado do uso dos pools de HLMs, o que pode ter mascarado a variabilidade interindividual da atividade biológica das isoformas de CYPs. Assim, outras abordagens de estudos de fenotipagem foram realizadas para obter informações mais precisas.

3.3.2.4. Metabolismo do montelucaste em isoformas de CYPs

As velocidades de formação ($\mu\text{mol metabólito}/\text{min}/\mu\text{mol P450}$) do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo oxidativo do montelucaste ($1,0 \mu\text{mol/L}$) em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs estão ilustradas na Figura 3.10. As isoformas que mostraram maior contribuição para a velocidade de formação dos metabólitos oxidativos do montelucaste foram as CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 e CYP3A5.

As maiores velocidades de formação do montelucaste 1,2 diol foram catalisadas pela CYP2C8 e CYP2C9, com a velocidade de formação em CYP2C9 mostrando-se 5,6 vezes maior do que em CYP2C8. Estes dados são parcialmente consistentes com as análises de correlação em HLMs, a qual não mostrou correlação significativa entre a velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol e a atividade da CYP2C9, e correlação significativa com a atividade das isoformas CYP2C8, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11.

As isoformas CYP3A4 e CYP3A5 foram as enzimas que mostraram a maior velocidade de formação para os metabólitos 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste, com a velocidade de formação em CYP3A4 de 8,1 e 5,9 vezes maior que a velocidade de formação quando em CYP3A5, respectivamente. Estes dados estão parcialmente de acordo com as análises de correlação em HLMs, uma vez que a formação dos metabólitos 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste correlacionou-se significativamente com atividade da CYP3A4, mas a formação destes metabólitos não foi observada em CYP2A6, CYP2B6 e CYP2C19.

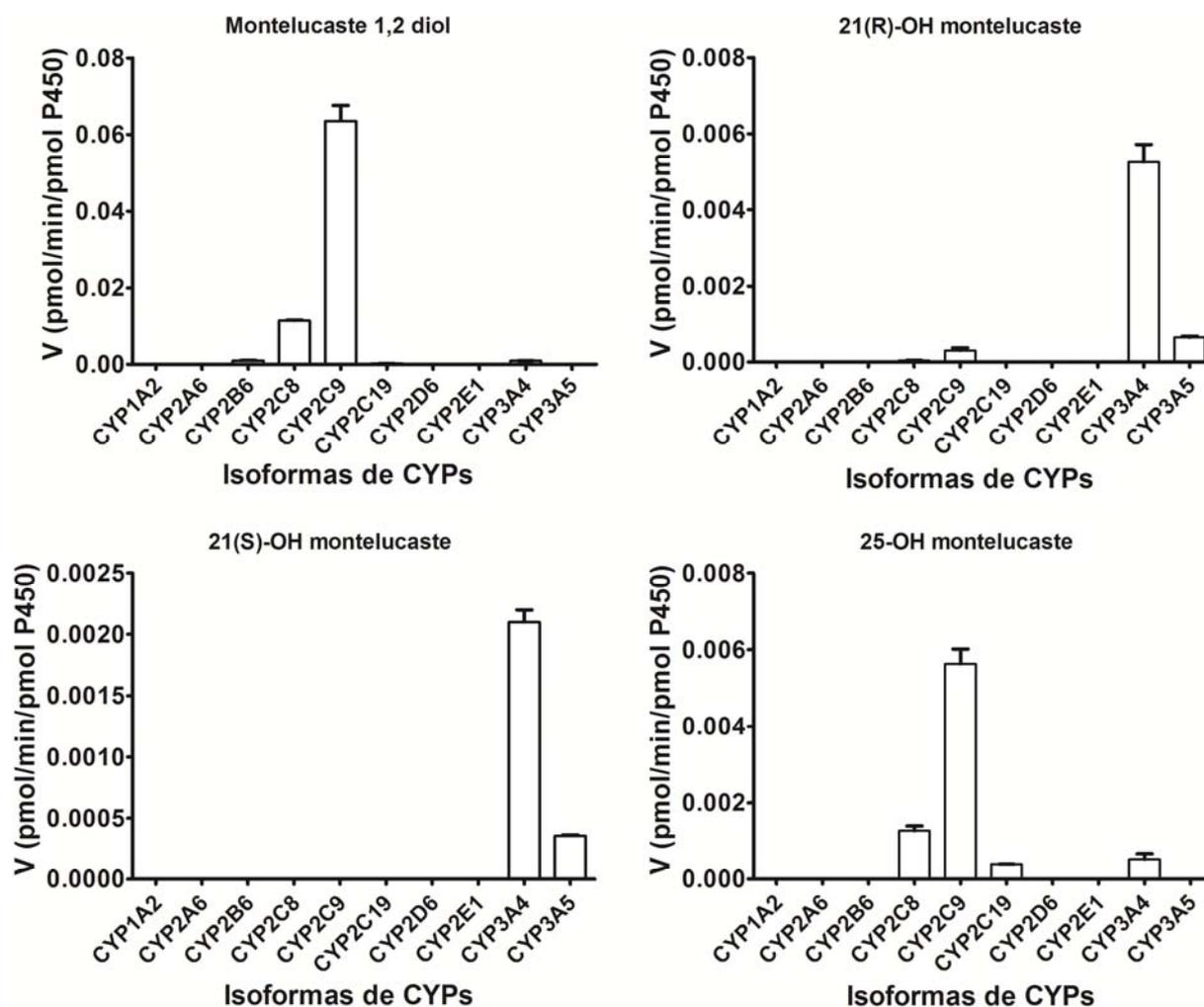


FIGURA 3.10 - Velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs. Montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com cada isoforma de CYP (20 pmol) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 37 $^{\circ}\text{C}$.

A formação do 25-OH montelucaste foi observada em CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4, mas com a maior contribuição das isoformas CYP2C8 e CYP2C9. A velocidade de formação do 25-OH montelucaste em CYP2C9 foi 4,4 vezes maior que em CYP2C8. Como observado para o metabólito montelucaste 1,2 diol, estes resultados não são totalmente consistentes com as análises de correlação em HLMs, as quais mostraram uma correlação não significativa da velocidade de formação com a atividade da CYP2C9 e uma correlação significativa com a atividade das CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11.

Apesar da contaminação com montelucaste sulfóxido do padrão do montelucaste, nas análises utilizando o painel de isoformas expressas de CYPs foi

possível identificar qualitativamente que a CYP3A4 foi claramente a principal enzima responsável pela formação do montelucaste sulfóxido (Figura 3.11), o que está de acordo com estudos prévios de metabolismo do montelucaste.¹⁷¹

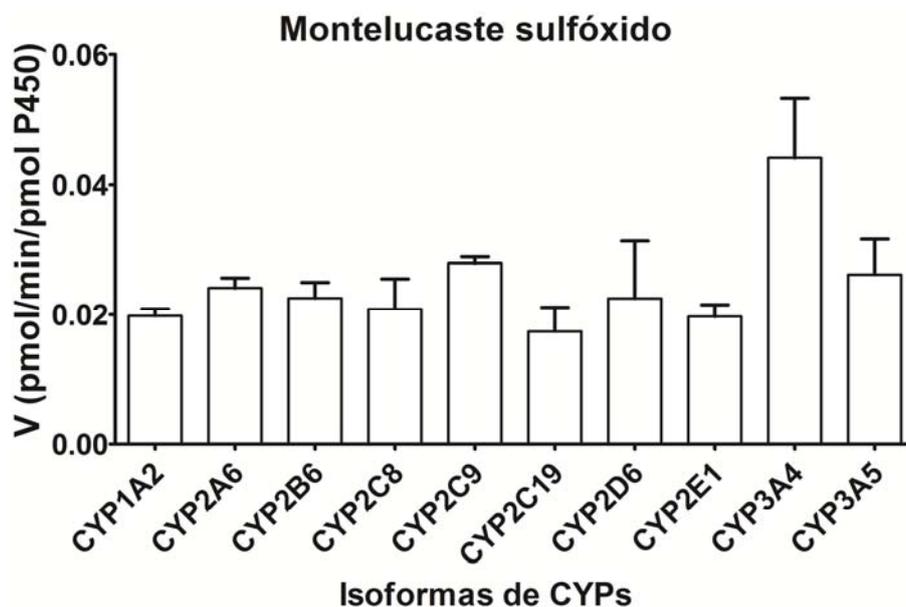


FIGURA 3.11 - Velocidade de formação do montelucaste sulfóxido em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs. Montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com cada isoforma de CYP (20 pmol) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 37 $^{\circ}\text{C}$.

As velocidades de formação (pmol metabólito/min/pmol P450) dos metabólitos oxidativos do montelucaste também foram avaliadas a partir do metabolismo do montelucaste (0,02 $\mu\text{mol/L}$) em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs e estão ilustradas na Figura 3.12. Nesta concentração de montelucaste avaliada, somente as concentrações de montelucaste 1,2 diol e 21(R)-OH montelucaste foram determinadas enquanto os outros metabólitos tiveram as suas concentrações abaixo do limite de quantificação do método.

Consistentemente com as análises utilizando montelucaste 1,0 $\mu\text{mol/L}$, a velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol foi catalisada pelas CYP2C8 e CYP2C9, com a velocidade de formação em CYP2C9 sendo 1,8 vezes maior que em CYP2C8. A formação do metabólito 21(R)-OH montelucaste foi catalisada somente pela CYP3A4, indicando o seu envolvimento majoritário na formação deste metabólito.

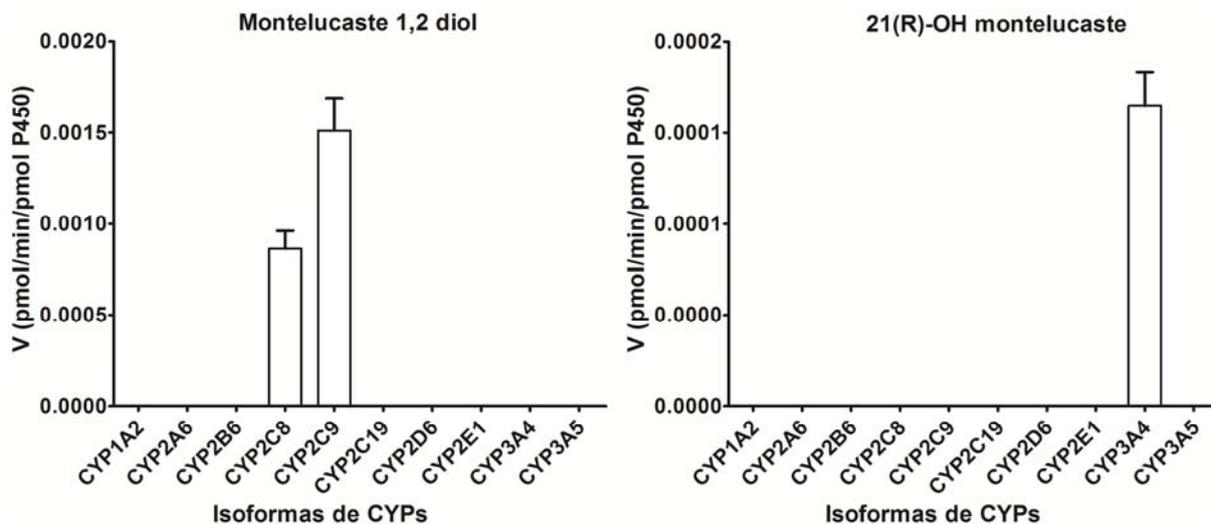


FIGURA 3.12 - Velocidade de formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste em um painel de 10 isoformas expressas de CYPs. Montelukaste (0,02 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado com cada isoforma de CYP (20 pmol) na presença da solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Os metabólitos 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste ficaram abaixo do limite de quantificação nesta concentração de montelukaste avaliada.

A fim de obter informações adicionais sobre as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo do montelukaste, análises cinéticas detalhadas foram realizadas com as isoformas de CYPs que mostraram maiores velocidades de formação dos metabólitos nos ensaios realizados anteriormente. De acordo com os painéis de HLMs e CYPs expressas, as isoformas CYP2C8 e CYP2C9 são as principais enzimas envolvidas na formação do montelukaste 1,2 diol e 25-OH montelukaste, enquanto que a CYP3A4 é a principal enzima envolvida na formação dos metabólitos 21(R)-OH montelukaste e 21(S)-OH montelukaste. Além das principais enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo do montelukaste foi observado nas análises de correlação que a atividade da CYP2C19 mostrou uma boa correlação ($r > 0,81$ e $p < 0,0004$) com a formação dos quatro hidroximetabólitos. Adicionalmente, CYP4A11, nunca mencionado na literatura com uma das CYP P450s envolvidas no metabolismo do montelukaste, mostrou uma boa correlação entre a sua atividade e a velocidade de formação do montelukaste 1,2 diol ($r = 0,814$ e $p = 0,0004$) e 25-OH montelukaste ($r = 0,613$ e $p = 0,0198$). Assim, CYP4A11 e CYP2C19 foram também incluídos nas análises cinéticas. Embora as atividades de CYP2A6 e CYP2B6 tenha mostrado uma correlação significativa com a velocidade de formação dos metabólitos do montelukaste em HLMs, estas CYPs

não foram incluídas nas análises cinéticas, pois estas isoformas mostraram baixa ou nenhuma velocidade de formação dos metabólitos nas análises utilizando o painel de CYPs expressas.

Consistentemente com os resultados obtidos em HLMS, as velocidades de formação dos hidroxi-metabólitos na curva de concentração-resposta em CYPs expressas foram caracterizadas por uma curva de saturação hiperbólica e a cinética foi bem descrita pela equação de Michaelis-Menten. Os perfis cinéticos do metabolismo do montelukaste para os metabólitos montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste em CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11 estão ilustrados na Figura 3.13.

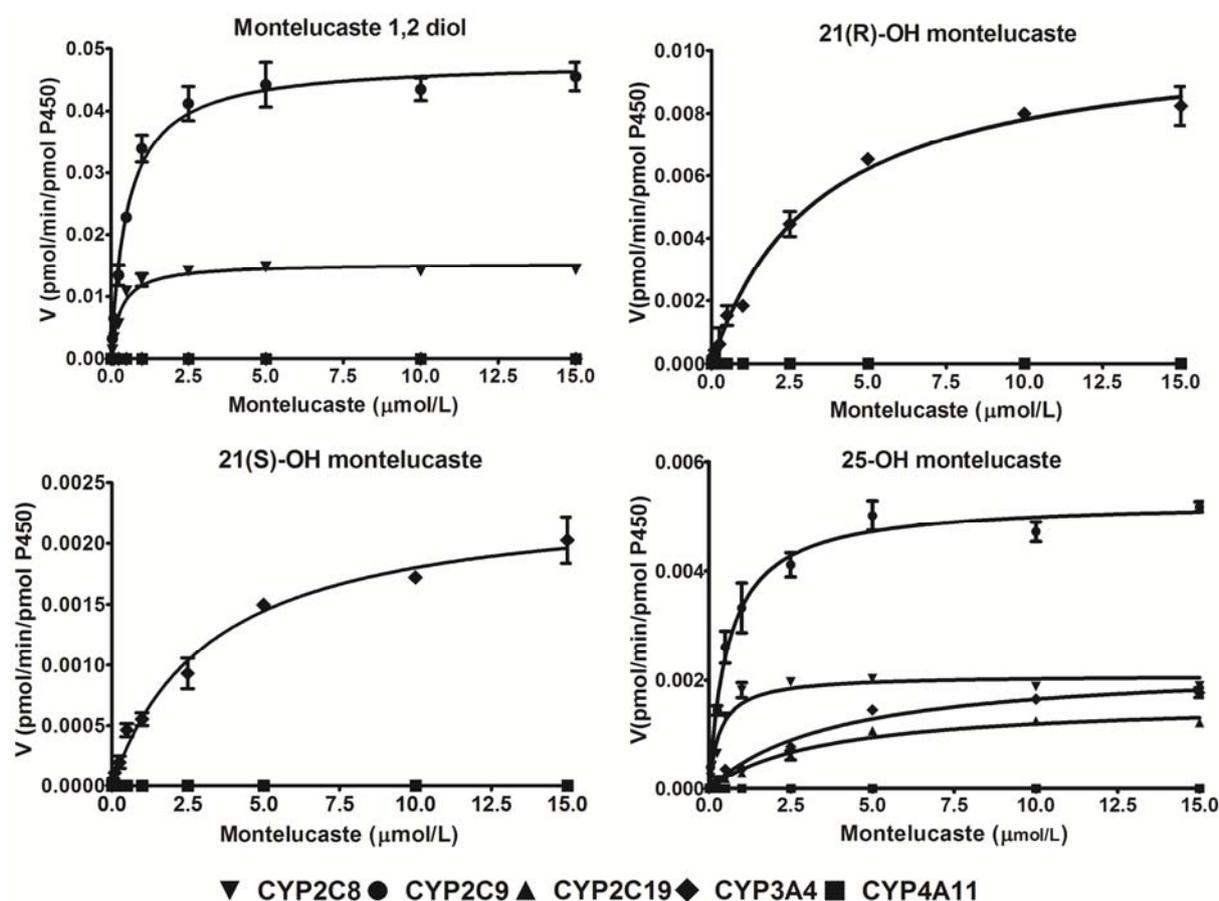


FIGURA 3.13 - Perfil cinético representativo da formação do montelukaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelukaste, 21(S)-OH montelukaste e 25-OH montelukaste a partir do metabolismo do montelukaste utilizando as isoformas expressas CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP4A11. Concentrações crescentes de montelukaste (0-15 μmol/L) foram incubadas com cada isoforma (20 pmol) e sistema gerador de NADPH por 30 min a 37°C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações.

Os parâmetros cinéticos aparentes para os quatro metabólitos estão sumarizados na Tabela 3.5. De acordo com os parâmetros cinéticos as CYP2C8 e CYP2C9 são as principais enzimas responsáveis pela formação do montelucaste 1,2 diol, pois apresentam os menores valores de K_m (0,31 e 0,53 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente), os quais são similares e próximos ao valor observado nos experimentos utilizando HLMs (média 0,32 $\mu\text{mol/L}$), indicando que estas mesmas enzimas possam ser as principais enzimas envolvidas na formação do montelucaste 1,2 diol em ensaios utilizando HLMs. O Cl_{int} aparente para a formação do montelucaste 1,2 diol em CYP2C9 foi 1,8 vezes maior do que em CYP2C8. Adicionalmente, os gráficos de Eadie-Hofstee do montelucaste 1,2 diol sugerem uma cinética monofásica em HLMs. Estes resultados sugerem que CYP2C8 e CYP2C9 estão comparavelmente envolvidas na formação do montelucaste 1,2 diol, ou seja, que estas enzimas metabolizam o montelucaste com a mesma afinidade para a formação do montelucaste 1,2 diol. As análises cinéticas em CYP2C9 e CYP4A11 para formação do montelucaste 1,2 diol não foram possíveis, pois não foi observada a formação deste metabólito nas condições analíticas utilizadas.

TABELA 3.5 – Parâmetros cinéticos para a formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste a partir do metabolismo do montelucaste utilizando as isoformas expressas CYP2C8, CYP2C9 e CYP3A4

Metabólitos	CYP2C8			CYP2C9			CYP3A4		
	V_{max}	K_m	Cl_{int}	V_{max}	K_m	Cl_{int}	V_{max}	K_m	Cl_{int}
Montelucaste 1,2 diol	0,015	0,31	0,05	0,048	0,53	0,091	-	-	-
21(R)-OH montelucaste	-	-	-	-	-	-	0,011	3,41	0,003
21(S)-OH montelucaste	-	-	-	-	-	-	0,002	3,25	0,0007
25-OH montelucaste	0,002	0,33	0,006	0,005	0,59	0,009	0,002	3,89	0,0006

Os parâmetros cinéticos para a formação dos metabólitos oxidativos do montelucaste foram estimados através da equação de Michaelis-Menten.

V_{max} : pmol/min/pmol proteína; K_m : $\mu\text{mol/L}$; Cl_{int} : $\mu\text{L/min/pmol}$ proteína

As análises cinéticas para a formação dos metabólitos 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste mostraram claramente que a CYP3A4 é a principal enzima que catalisa a formação destes metabólitos, com valores de K_m de 3,4 e 3,3 $\mu\text{mol/L}$ e Cl_{int} aparente de 0,0031 e 0,0007 $\mu\text{L/min/pmol}$ proteína,

respectivamente. Estes metabólitos mostraram valores de K_m muito similares, mas o 21(R)-OH montelucaste mostrou Cl_{int} aparente 4,4 vezes maior que o 21(S)-OH montelucaste, o que sugere maior capacidade catalítica da CYP3A4 para a formação do 21(R)-OH montelucaste. Os valores de K_m foram próximos aos observados a partir de análises em HLMs, sendo estes de $\sim 2,0$ e $3,0 \mu\text{mol/L}$, respectivamente para 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste, sugerindo que a CYP3A4 possa ser a principal enzima envolvida na formação destes metabólitos em ensaios utilizando HLMs. Como ocorreu para o montelucaste 1,2 diol, as análises cinéticas destes metabólitos em CYP2C19, a qual mostrou uma boa correlação com a formação do 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste, não foram possíveis pois não foi observada a formação destes metabólitos nas condições analíticas utilizadas.

A formação do metabólito 25-OH montelucaste mostrou ser catalisada pela CYP CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 com valores de K_m de 0,33, 0,59, 3,5 e $3,9 \mu\text{mol/L}$ e Cl_{int} aparente de 0,006, 0,009, 0,0006 e 0,0005 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol}$ proteína, respectivamente. Com base nestas análises cinéticas podemos sugerir que CYP2C8 e CYP2C9 foram as principais enzimas responsáveis pela formação do 25-OH montelucaste com menor contribuição das CYP2C19 e CYP3A4. O valor de K_m em análises utilizando HLMs ($0,34 \mu\text{mol/L}$) foi similar ao obtido pelas CYP2C8 e CYP2C9, o que sugere que estas enzimas possam ser as principais enzimas envolvidas na formação do 25-OH montelucaste em ensaios utilizando HLMs.

3.3.2.5. Inibição química do metabolismo oxidativo do montelucaste

O efeito de inibidores químicos específicos para as isoformas de CYPs no metabolismo oxidativo do montelucaste foram testados a fim de obter dados adicionais e confirmatórios das principais enzimas responsáveis pelo metabolismo. Como mostrado na Figura 3.14 e na Tabela 3.6, cetoconazol e troleandomicina; inibidores específicos da CYP3A; inibiram mais que 90,0% da formação dos metabólitos 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste. Os efeitos destes inibidores na formação do 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste estão de acordo com as análises de correlação e ensaios utilizando isoformas expressas de CYPs e fortemente sugerem que a CYP3A4 é a principal enzima envolvida na formação destes metabólitos. Adicionalmente, pilocarpina, tiotepa e sulfafenazol,

inibidores específicos da CYP2A6, CYP2B6 e CYP2C9, respectivamente, também mostraram um efeito inibitório em menor extensão na formação do 21(R)-OH montelucaste e 21(S)-OH montelucaste com uma inibição de cerca de 40,0-50,0% da velocidade de formação.

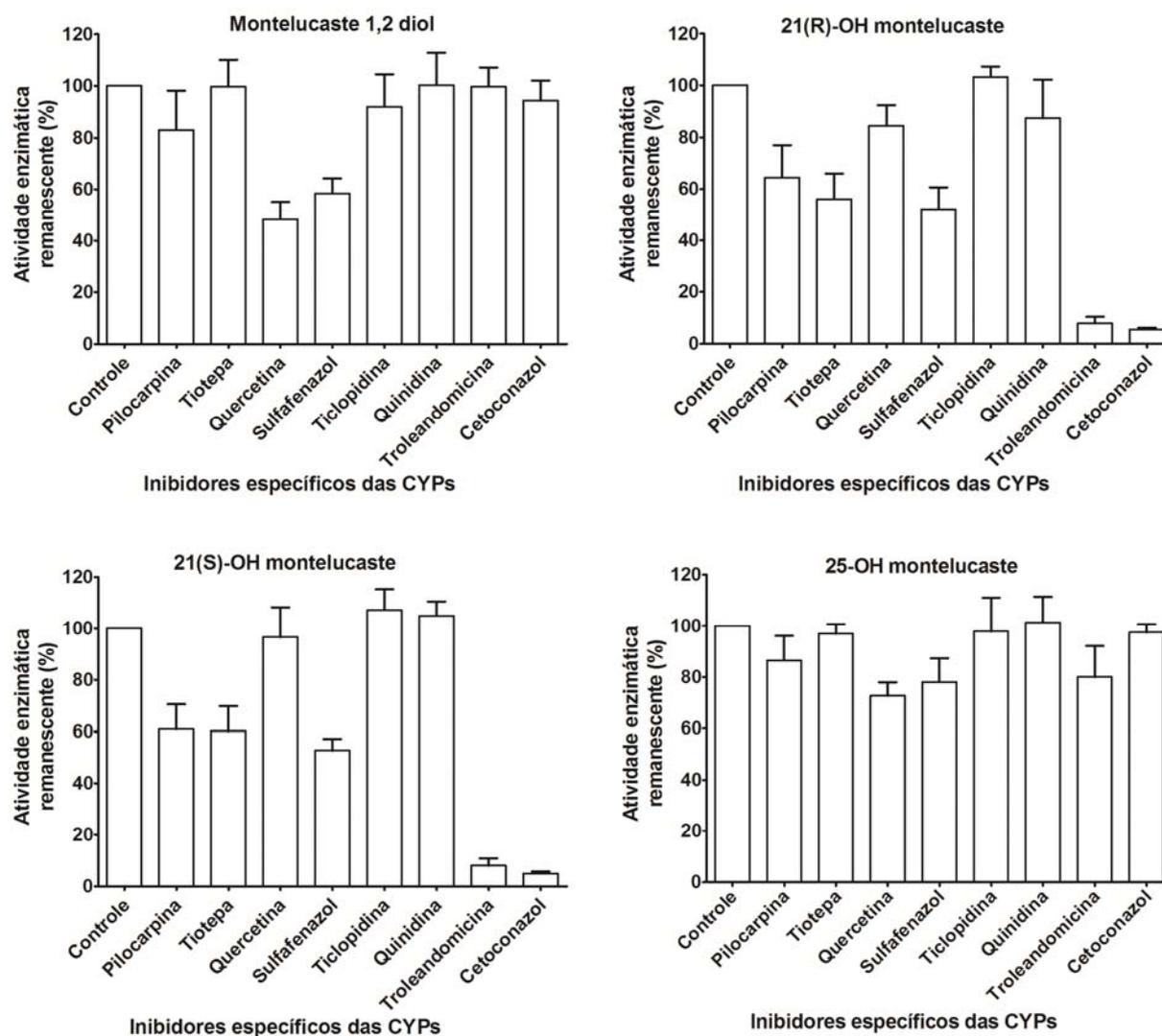


FIGURA 3.14 - Inibição química da formação do montelucaste 1,2 diol, 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e 25-OH montelucaste por inibidores seletivos das isoformas de CYPs em HLMs. Montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado na presença de inibidores químicos, HLMs (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 30 min a 37 °C. Os dados de inibição estão apresentados como a média \pm S.D. ($n= 2$ experimentos independentes em duplicata). As velocidades de formação dos hidroximetabólitos do montelucaste durante a incubação com inibidores estão apresentadas como porcentagem em relação à atividade do controle (na ausência do inibidor em quadruplicata).

A quercetina e o sulfafenazol, inibidores específicos da CYP2C8 e CYP2C9, respectivamente, inibiu a velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol em aproximadamente 51,6 e 42,5%, respectivamente. O que está de acordo com os ensaios em CYPs expressas, os quais indicam que ambas isoformas estão envolvidas na formação do montelucaste 1,2 diol. Adicionalmente, ticlopidina um inibidor dual da CYP2B6 e CYP2C19 não mostrou efeito inibitório relevante (~8,0%) na velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol, o que indica que as isoformas CYP2C8 e CYP2C9 são as principais enzimas envolvidas na formação do montelucaste 1,2 diol.

TABELA 3.6 – Inibição química do metabolismo do montelucaste por inibidores seletivos das isoformas de CYPs em HLMs

Inibidores	CYPs	1,2 diol	21(R)-OH	21(S)-OH	25-OH
Ausência de inibidor	Controle	100,0	100,0	100,0	100,0
Pilocarpina	CYP2A6	83,2 ± 15,0	64,5 ± 12,6	60,9 ± 9,6	86,5 ± 9,7
Tiotepa	CYP2B6	99,7 ± 10,4	56,0 ± 10,0	60,2 ± 9,7	96,9 ± 3,8
Quercetina	CYP2C8	48,4 ± 6,7	84,6 ± 7,7	96,7 ± 11,6	72,7 ± 5,2
Sulfafenazol	CYP2C9	58,4 ± 5,8	52,1 ± 8,5	52,7 ± 4,5	78,0 ± 9,4
Ticlopidina	CYP2C19	92,0 ± 12,6	103,3 ± 4,0	107,2 ± 8,1	97,9 ± 13,2
Quinidina	CYP2D6	98,2 ± 13,4	87,5 ± 14,7	105,0 ± 5,5	101,4 ± 10,1
Troleandomicina	CYP3A	99,7 ± 7,4	7,9 ± 2,4	8,1 ± 2,8	80,0 ± 12,1
Cetoconazol	CYP3A	94,3 ± 7,8	5,6 ± 0,6	5,0 ± 0,8	97,5 ± 3,1

Os dados de inibição estão apresentados como a média ± S.D. ($n= 2$ experimentos independentes em duplicata). As velocidades de formação dos hidroximetabólitos do montelucaste durante a incubação com inibidores estão apresentadas como porcentagem em relação à atividade do controle (na ausência do inibidor em quadruplicata).

A velocidade de formação do metabólito 25-OH montelucaste foi inibida principalmente por quercetina e sulfafenazol em cerca de 27,0 e 22,0%, respectivamente, sugerindo que as isoformas CYP2C8 e CYP2C9 são as principais enzimas envolvidas na formação deste metabólito. Além disso, efeitos inibitórios de outros inibidores específicos foram observados, indicando que múltiplas enzimas estão envolvidas na formação do 25-OH montelucaste.

Na busca por dados confirmatórios da participação da CYP2C9 na formação do montelucaste 1,2 diol, montelucaste nas concentrações de 1,0 e 0,02 $\mu\text{mol/L}$ foi

incubado com quercetina, sulfafenazol e com ambos inibidores simultaneamente. Os resultados estão ilustrados na Figura 3.15. Os resultados obtidos confirmam que a CYP2C9 bem como a CYP2C8 estão envolvidas na formação do montelucaste 1,2 diol, pois a combinação dos inibidores quercetina e sulfafenazol inibiu a formação deste metabólito em cerca 80,3 e 88,9 % nas concentrações de 1,0 e 0,02 $\mu\text{mol/L}$ de montelucaste, respectivamente, o é que consideravelmente maior que o efeito inibitório individual da quercetina. Entretanto, não foi possível definir qual das enzimas é majoritariamente responsável pela formação do montelucaste 1,2 diol, pois os ensaios de inibição mostraram um maior efeito sobre a CYP2C8 e os ensaios utilizando CYPs expressas mostraram uma maior velocidade de formação do montelucaste 1,2 diol em CYP2C9.

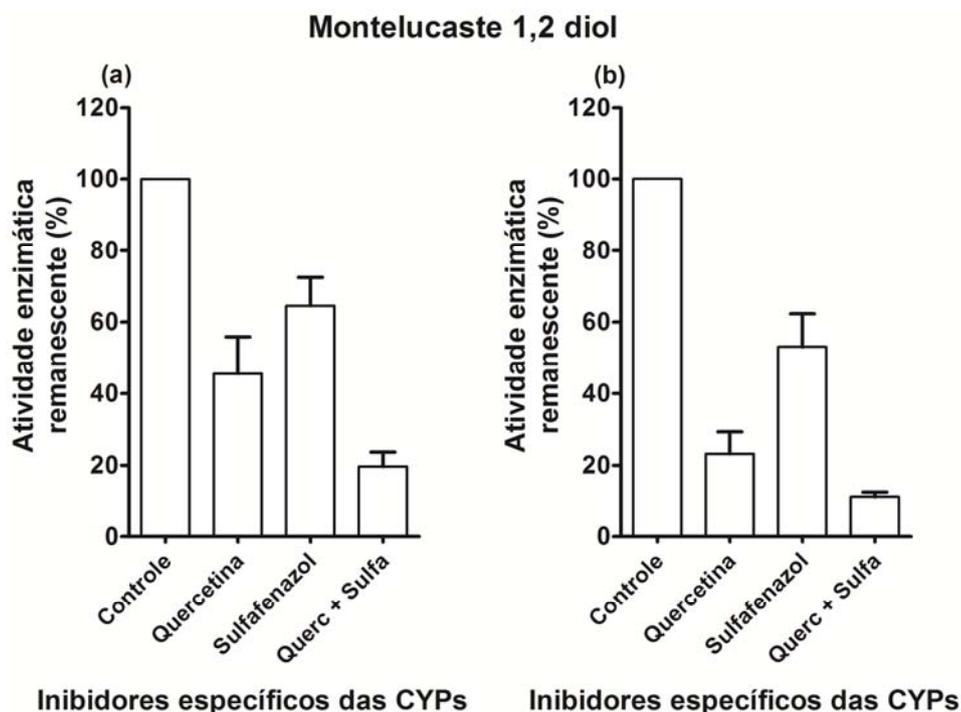


FIGURA 3.15 - Inibição química da formação do montelucaste 1,2 diol a partir do metabolismo do montelucaste (a) 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e (b) 0,02 $\mu\text{mol/L}$. Utilizando como inibidores específicos a quercetina (10 $\mu\text{mol/L}$), sulfafenazol (25 $\mu\text{mol/L}$) e ambos inibidores (quercetina (10 $\mu\text{mol/L}$) + Sulfafenazol (25 $\mu\text{mol/L}$)). Montelucaste (1,0 e 0,02 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado na presença dos inibidores químicos, HLMs (0,25 mg/mL), solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L; pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH por 30min a 37°C. As velocidades de formação dos hidroxí-metabólitos do montelucaste durante a incubação com inibidores estão apresentadas como porcentagem em relação a atividade do controle (na ausência do inibidor em quadruplicata). Os dados de inibição estão apresentados como a média de duplicatas.

No presente estudo, análises de correlação em HLMs, ensaios utilizando isoformas expressas de CYPs e ensaios de inibição química foram realizados em concentrações terapeuticamente relevantes de montelukaste (1,0 e 0,02 $\mu\text{mol/L}$) a fim de identificar as isoformas de CYP P450s envolvidas no metabolismo oxidativo deste fármaco. Consistentemente, os resultados indicaram que a formação do montelukaste 1,2 diol foi catalisada por CYP2C8 e CYP2C9 e que a formação dos metabólitos 21(R)-OH montelukaste e 21(S)-OH montelukaste foi catalisada pela CYP3A4, enquanto a formação do 25-OH montelukaste foi catalisada por múltiplas enzimas CYP2C8>2C9>3A4>2C19. Adicionalmente, qualitativamente e baseando-se nos resultados do painel das isoformas expressas de CYPs, nós sugerimos que a formação do montelukaste sulfóxido foi principalmente catalisada pela CYP3A4.

De modo geral, o presente estudo concorda amplamente com os estudos *in vitro* e *in vivo* previamente reportados na literatura,¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ que relatam a contribuição da CYP2C9 ou CYP2C8 no montelukaste. No entanto, este é o primeiro trabalho a demonstrar em concentrações terapeuticamente relevantes de montelukaste que ambas isoformas, CYP2C8 e CYP2C9, estão comparavelmente envolvidas na formação do montelukaste 1,2 diol e, portanto, que esta reação não é seletiva para ser utilizada com um marcador da CYP2C8.

3.3.3. Metabolismo *in vitro* do montelukaste via UGTs

Com o objetivo de avaliar a formação de glucuronídeos do montelukaste, as principais isoformas de UGTs envolvidas na formação destes metabólitos e a contribuição da via de glucuronidação na eliminação do montelukaste, foram realizadas incubações de montelukaste na presença de HLMs e do cofator UDPGA. A glucuronidação direta do montelukaste foi previamente reportada por BALANI et al. (1997),¹⁵⁹ o qual detectou montelukaste acil- β -D-glucuronídeo *in vivo* como um metabólito minoritário, e também por CHIBA et al. (1997),¹⁷¹ o qual demonstrou *in vitro* que a velocidade de formação do montelukaste acil- β -D-glucuronídeo é substancialmente maior que a dos metabólitos provenientes do metabolismo oxidativo. No entanto, nenhum estudo adicional foi realizado nestes trabalhos.

Nas análises exploratórias da glucuronidação do montelukaste foram utilizadas as condições de incubação otimizadas nos estudos de influência das condições de incubação no metabolismo via CYPs e UGTs (item 3.2.6), e as

condições cromatográficas descritas no item 3.2.2. Após a incubação do montelukaste com HLMS na presença do cofator UDPGA, dois potenciais glucuronídeos eluindo em 3,3 e 3,8 min foram observados (Figura 3.16). O glucuronídeo eluindo em 3,8 min corresponde ao montelukaste acil- β -D-glucuronídeo, o qual foi definido com base no padrão analítico, e o glucuronídeo eluindo em 3,3 min trata-se de um metabólito não reportado previamente e foi denominado M-glucuronídeo. O M-glucuronídeo apresentou sua forma protonada $[M+H]^+$ m/z 762 e padrão de fragmentação (m/z 762 > 422) idêntico ao montelukaste acil- β -D-glucuronídeo. No entanto, estes metabólitos possuem diferentes polaridades e, conseqüentemente, diferentes tempos de retenção cromatográfica. De acordo com a estrutura química do montelukaste dois grupos funcionais estão suscetíveis à glucuronidação direta, sendo um o ácido carboxílico levando a formação do montelukaste acil- β -D-glucuronídeo e o segundo o grupo hidroxila levando à formação de um éter-glucuronídeo. Portanto, apesar de serem necessárias análises por RMN para confirmação da estrutura química, nós sugerimos que o M-glucuronídeo seja o montelukaste éter-glucuronídeo. Nenhum destes metabólitos foi observado nos ensaios de controle negativo. A Figura 3.16 ilustra o perfil cromatográfico obtido por LC-MS para o montelukaste e seus glucuronídeos.

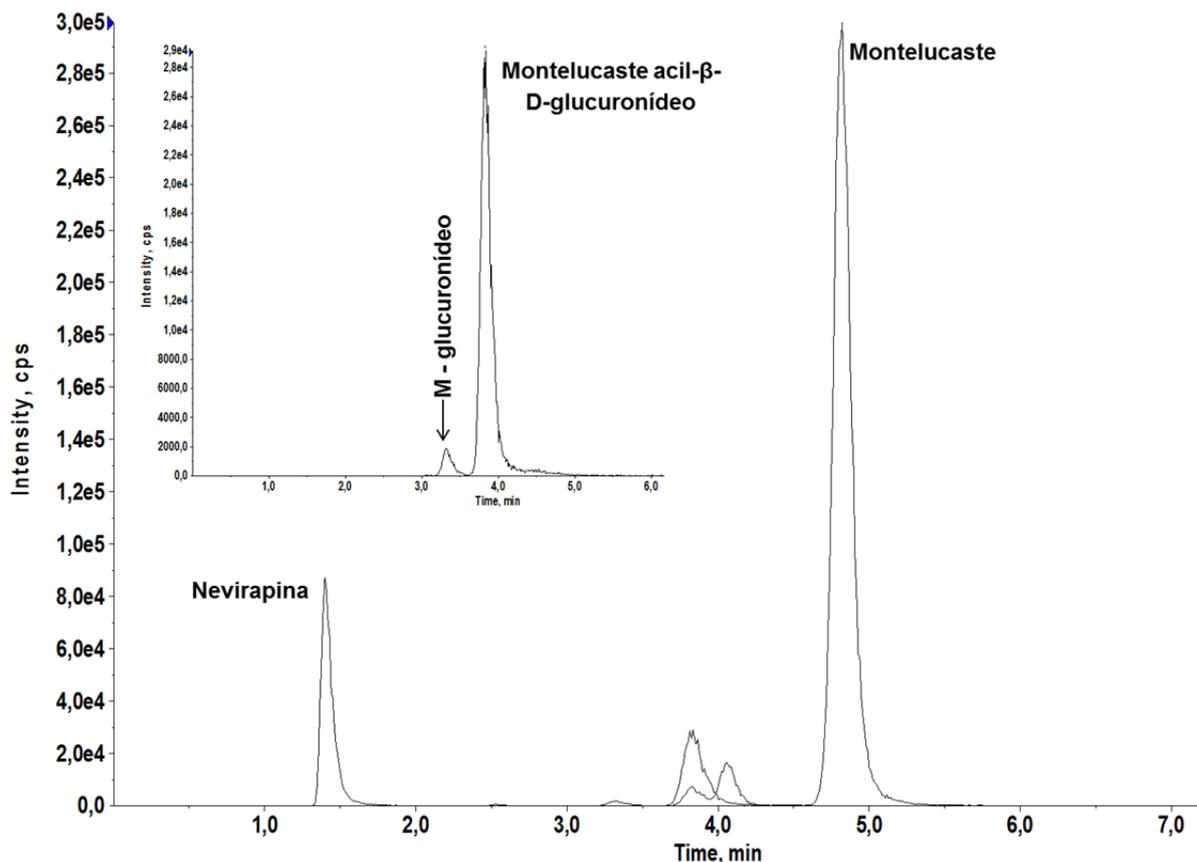


FIGURA 3.16 – Cromatograma representativo do perfil de separação obtido por LC-MS/MS no modo SRM para montelucaste e seus glucuronídeos provenientes da incubação de montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) em solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl_2 (5,0 mmol/L), HLMs (0,25 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C. coluna Luna C18 (100 x 2,0 mm; 3 μm); fase móvel: acetonitrila/água acidificada (0,1% de ácido fórmico) 82:18 (v/v); vazão de 0,2 mL/min e volume de injeção de 10 μL . As transições monitoradas estão descritas na Tabela 3.1.

3.3.3.1. Determinação da linearidade de formação dos glucuronídeos do montelucaste

Os experimentos exploratórios demonstraram que a formação dos glucuronídeos do montelucaste foi dependente do tempo de incubação, concentração proteica, concentração do montelucaste e da presença do cofator UDPGA. As condições de linearidade para a formação dos glucuronídeos provenientes da incubação do montelucaste foram estabelecidas como 30 min e 0,25 mg/mL em relação ao tempo de incubação e concentração proteica, respectivamente. Esses valores foram determinados na região linear das curvas de tempo de incubação e concentração proteica *versus* formação dos glucuronídeos, os

quais também resultaram em uma boa sensibilidade para os dois glucuronídeos nas condições de análise por LC-MS/MS adotadas. A Figura 3.17 ilustra os resultados obtidos para os ensaios de determinação de linearidade de formação dos glucuronídeos do montelukaste.

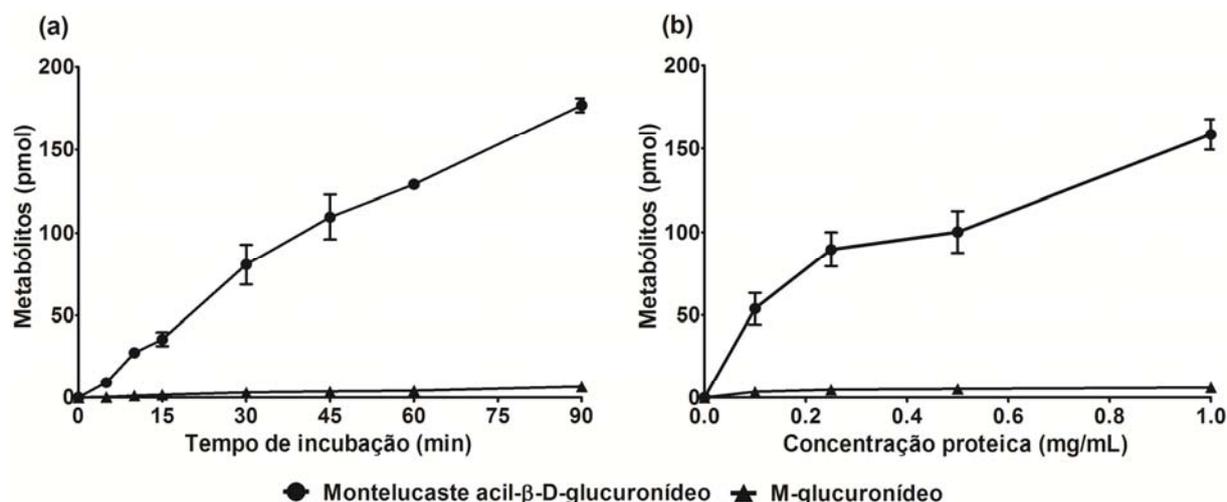


FIGURA 3.17 – Gráficos representativos da linearidade de formação dos glucuronídeos do montelukaste. (a) Curva de tempo de incubação x formação do glucuronídeo. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) foi incubado em solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl_2 (5,0 mmol/L), HLMs (0,25 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) à 37 °C. A reação foi terminada em 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 min de incubação. (b) Curva de concentração proteica x formação do glucuronídeo. Montelukaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) em solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl_2 (5,0 mmol/L), HLMs (0,0 – 1,0 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C.

3.3.3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para glucuronidação do montelukaste

As análises cinéticas da glucuronidação do montelukaste foram realizadas em duas diferentes preparações de HLMs. As velocidades de formação dos glucuronídeos na curva de concentração-resposta foram caracterizadas por uma curva de saturação hiperbólica e a cinética foi bem descrita pela equação de Michaelis-Menten. Os perfis cinéticos da glucuronidação do montelukaste para os metabólitos montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo em ambas as preparações de HLMs estão ilustrados na Figura 3.18. A Tabela 3.7 resume os parâmetros cinéticos obtidos para os dois glucuronídeos do montelukaste.

Baseando-se no Cl_{int} *in vitro* total para glucuronidação, calculado através da soma do Cl_{int} dos dois glucuronídeos e considerando os valores médios dos dois HLMs utilizados, o Cl_{int} referente à formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo representa 88,2% e o M-glucuronídeo representa 11,8% do Cl_{int} *in vitro* total, o que sugere que o montelucaste acil- β -D-glucuronídeo é o glucuronídeo majoritário.

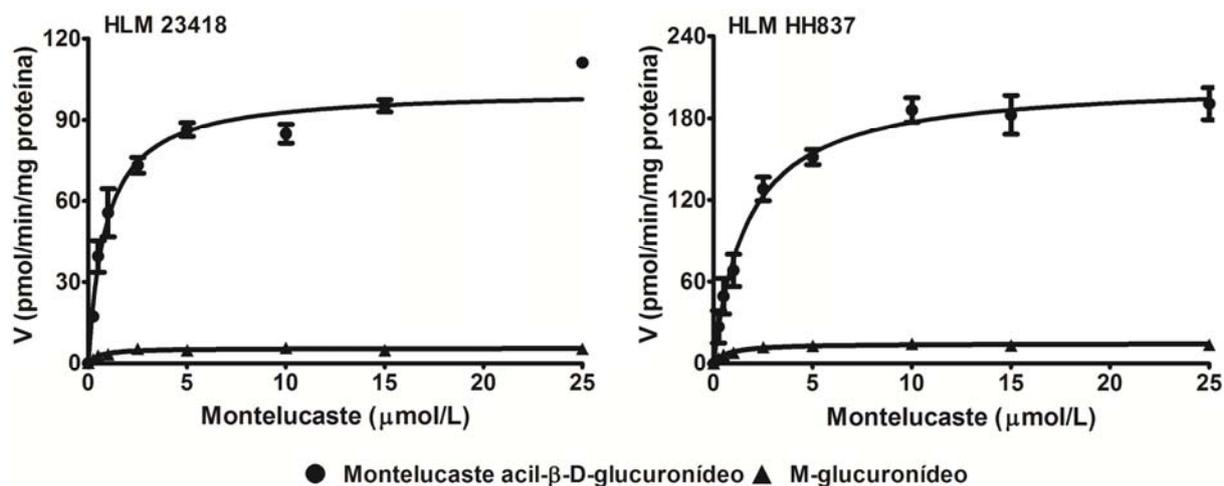


FIGURA 3.18 – Perfil cinético representativo da glucuronidação montelucaste em dois HLMs. Concentrações crescentes de montelucaste (0-25 $\mu\text{mol/L}$) foram incubadas com HLMs (0,25 mg/mL) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min a 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações.

TABELA 3.7- Parâmetros cinéticos para a formação do montelucaste acil- β -D- glucuronídeo e M-glucuronídeo a partir da glucuronidação do montelucaste utilizando duas preparações de HLMs e a isoforma expressa UGT1A3

Metabólitos	acil- β -D-glucuronídeo			M-glucuronídeo		
	V_{max}	K_m	Cl_{int}	V_{max}	K_m	Cl_{int}
HLM (HH837)	207,4	1,72	120,2	14,7	0,71	20,6
HLM (23418)	101,1	0,90	112,5	5,59	0,53	10,5
UGT 1A3	145,1	1,97	73,5	2,86	0,37	7,78

Os parâmetros cinéticos para a formação dos metabólitos oxidativos do montelucaste foram estimados através da equação de Michaelis-Menten.

V_{max} : pmol/min/pmol proteína; K_m : $\mu\text{mol/L}$; Cl_{int} : $\mu\text{L/min/pmol}$ proteína

Os gráficos de Eadie-Hofstee para a formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo e M-glucuronídeo a partir da glucuronidação do montelucaste em dois HLMs estão ilustrados na Figura 3.19, a qual mostra uma relação linear entre a

velocidade de formação e a razão velocidade/concentração de montelukaste, indicando a ausência de cooperatividade e o envolvimento de apenas uma enzima na formação destes metabólitos ou mais de uma enzima com afinidade similar.

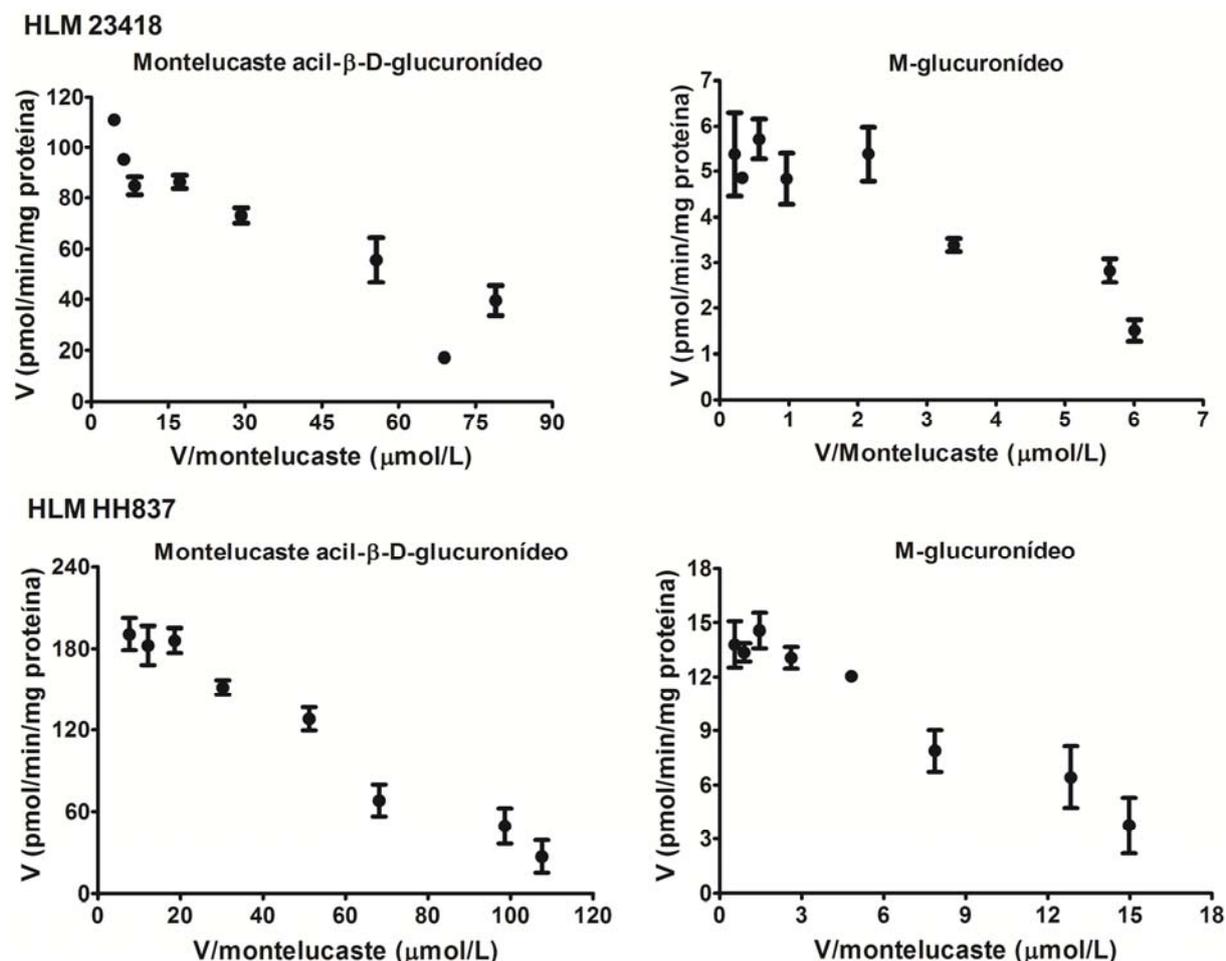


FIGURA 3.19 – Gráficos de Eadie-Hofstee para a glucuronidação do montelukaste em duas preparações de HLMs.

Os valores de K_m obtidos para o montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo foram similares ($< 2 \mu\text{mol/L}$) e o V_{max} para o montelukaste acil-β-D-glucuronídeo foi muito maior que para o M-glucuronídeo, conseqüentemente, o Cl_{int} *in vitro* para a formação do montelukaste acil-β-D-glucuronídeo foi 7,5 maior que o Cl_{int} para o M-glucuronídeo. Considerando a estrutura química do montelukaste e a suposição de que M-glucuronídeo seja correspondente ao montelukaste éter glucuronídeo, está diferença no Cl_{int} pode ser, provavelmente, devido ao maior impedimento estérico na posição do grupo hidroxila do que no grupo carboxílico.

No estudo prévio de glucuronidação *in vitro* do montelucaste reportado na literatura, altos valores de K_m para a formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo foram reportados; ~18 e 24 $\mu\text{mol/L}$ em HLMs de adultos e crianças, respectivamente. Estes valores são mais de 9 vezes maiores que o reportado no presente estudo, no entanto, a comparação direta dos parâmetros cinéticos reportados no presente estudo com os reportados na literatura¹⁷¹ é limitada, considerando as diferentes faixas de concentrações de montelucaste utilizadas nos ensaios de concentração-resposta; 0-25 $\mu\text{mol/L}$ no presente estudo *versus* 100-500 $\mu\text{mol/L}$ no estudo reportado na literatura.

3.3.3.3. Metabolismo do montelucaste em isoformas de UGTs

As velocidades de formação (pmol metabólito/min/mg proteína) do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo e M-glucuronídeo partir da glucuronidação do montelucaste (1,0 $\mu\text{mol/L}$) em um painel de 13 isoformas expressas de UGTs estão ilustradas na Figura 3.20. Dentre as 13 isoformas de UGTs avaliadas, inequivocamente uma única isoforma mostrou maior contribuição para a velocidade de formação dos glucuronídeos do montelucaste, a UGT1A3. O que está de acordo com o observado no gráfico Eadie-Hofstee, o qual indicou o envolvimento de apenas uma enzima na formação destes metabólitos. Como observado nos experimentos utilizando HLMs, a velocidade de formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo em UGT1A3 foi muito maior (~10 vezes) que a velocidade de formação do M-glucuronídeo.

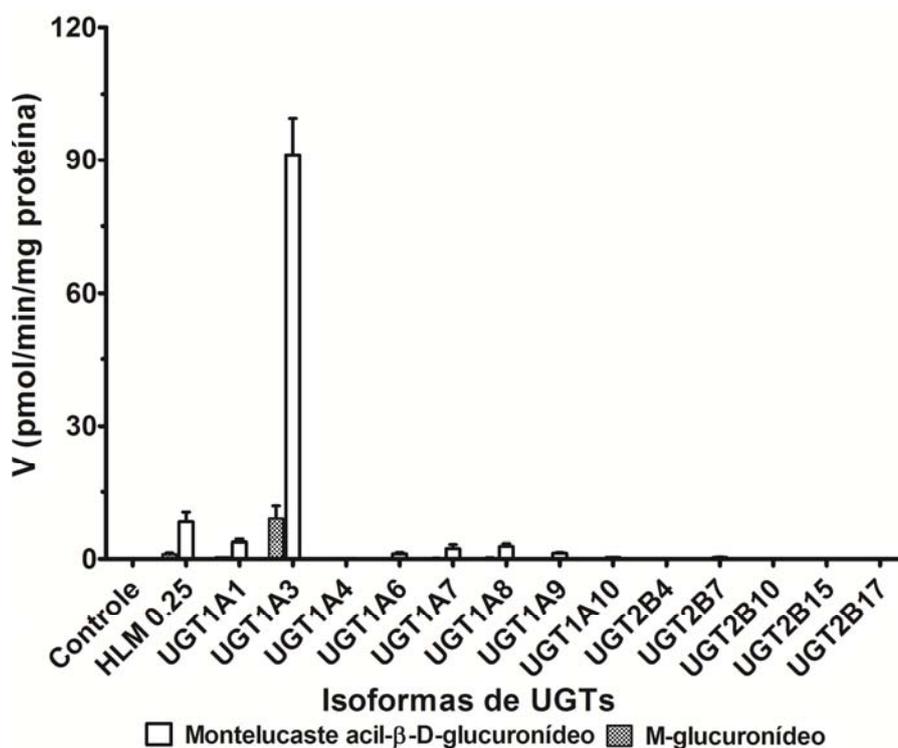


FIGURA 3.20 - Velocidade de formação do montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo em um panel de 13 isoformas expressas de UGTs. Montelukaste (1,0 μmol/L) foi incubado com cada isoforma expressa de UGT (0,025 mg/mL) na presença de solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl₂ (5,0 mmol/L) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C.

Análises cinéticas detalhadas da glucuronidação do montelukaste foram realizadas utilizando a isoformas UGT1A3. As velocidades de formação dos glucuronídeos na curva de concentração-resposta em UGT1A3 foram caracterizadas por uma curva de saturação hiperbólica e a cinética descrita pela equação de Michaelis-Menten. Os perfis cinéticos da glucuronidação do montelukaste para os metabólitos montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo em UGT1A3 estão ilustrados na Figura 3.21. A Tabela 3.7 resume os parâmetros cinéticos obtidos para os dois glucuronídeos do montelukaste em UGT1A3.

Os valores de K_m obtidos para montelukaste acil-β-D-glucuronídeo e M-glucuronídeo foram ~2,0 e 0,37 μmol/L, respectivamente, os quais foram próximos aos valores obtidos a partir da glucuronidação em HLMs (média de 1,3 e 0,62 μmol/L, respectivamente), sugerindo que está enzima catalisa a glucuronidação do montelukaste em HLMs. Os valores de Cl_{int} aparente para a formação do montelukaste acil-β-D-glucuronídeo em UGT1A3 foi 9,5 vezes maior que para a

formação do M-glucuronídeo, indicando uma maior capacidade catalítica da isoforma UGT1A3 para a formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo.

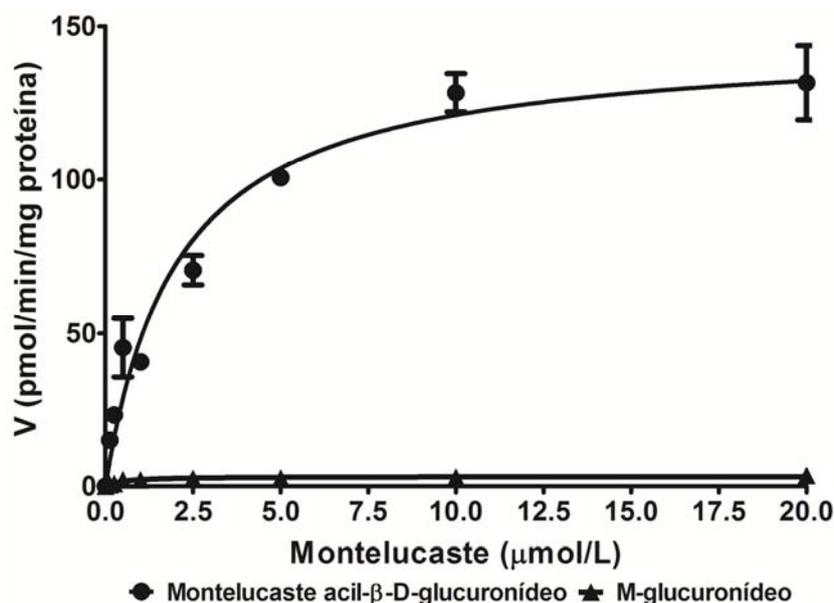


FIGURA 3.21 - Perfil cinético representativo da formação do montelucaste acil- β -D-glucuronídeo e M-glucuronídeo a partir da glucuronidação do montelucaste utilizando a isoforma expressa UGT1A3. Concentrações crescentes de montelucaste (0-20 $\mu\text{mol/L}$) foram incubadas com isoforma expressa de UGT1A3 (0,025 mg/mL) na presença de solução tampão tris-HCl (0,1 mol/L; pH 7,4) contendo MgCl_2 (5,0 mmol/L) e cofator UDPGA (5,0 mmol/L) por 30 min à 37 °C. Cada ponto representa a média de duplicatas de incubações.

3.3.4. Contribuição do metabolismo via CYP P450s e UGTs no *clearance in vitro* do montelucaste

Comparando os parâmetros cinéticos para a formação dos hidróxi-metabólitos do montelucaste com os parâmetros cinéticos para a formação dos glucuronídeos do montelucaste, a contribuição da via metabólica catalisada por CYPs parece ser minoritária. Embora os valores de K_m para as reações de oxidação e glucuronidação sejam comparáveis, maiores valores de V_{max} e, conseqüentemente, de Cl_{int} para a formação de glucuronídeos foram observados. A fim de avaliar a contribuição das vias metabólicas catalisadas por UGTs e CYPs no *clearance* total do montelucaste, todos os metabólitos observados neste estudo a partir do metabolismo de fase I e II do montelucaste foram considerados para calcular o Cl_{int} aparente total. Baseando-

se no Cl_{int} total observou-se que a glucuronidação do montelucaste representa 84,8% do Cl_{int} aparente total do montelucaste e que o metabolismo oxidativo representa 15,2 %. Este resultado sugere que a glucuronidação é a principal via responsável pela eliminação do montelucaste (Figura 3.22). Estes dados estão de acordo com os relatados de CHIBA et al. (1997),¹⁷¹ embora seus dados não foram discutidos no contexto de contribuição do metabolismo oxidativo *versus* glucuronidação no metabolismo do montelucaste. Contrariamente, BALANI et al. (1997)¹⁵⁹ quantificou montelucaste e seus metabólitos em bile humana e relatou o montelucaste acil- β -D-glucuronídeo como metabólito minoritário. O que pode ser proveniente da baixa estabilidade de glucuronídeos, particularmente em condições de pH neutro e levemente alcalino, o qual pode sofrer hidrólise tanto na bile (pH 8,0-8,5) ou durante o preparo de amostras.^{188,189} Deste modo, o presente estudo indica que a glucuronidação é o principal mecanismo de eliminação do montelucaste e que oxidação é a rota metabólica minoritária. A Figura 3.23 apresenta uma proposta das rotas metabólicas do montelucaste via CYPs e UGTs e das enzimas específicas envolvidas, baseando-se nos dados do presente estudo e em dados da literatura.

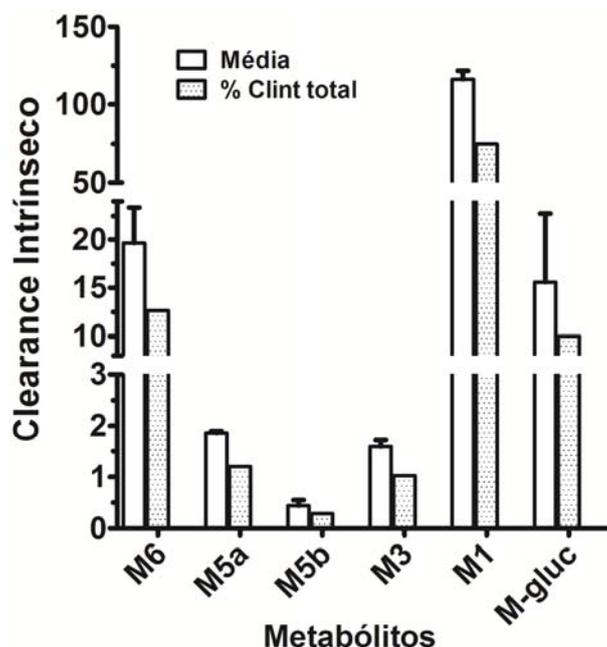


FIGURA 3.22 – Contribuição dos metabólitos do montelucaste; montelucaste 1,2 diol (M6), 21(R)-OH montelucaste (M5a), 21(S)-OH montelucaste (M5b), 25-OH montelucaste (M3), montelucaste acil- β -D-glucuronídeo (M1) e M-glucuronídeo (M-gluc); no Cl_{int} *in vitro* aparente. Média: representa a média de duplicatas de incubações em duas preparações de HLMS (Cl_{int} : μ L/min/mg protein). % Cl_{int} total: contribuição de cada metabólito (%) no Cl_{int} aparente total do monteculaste (via CYPs e UGTs).

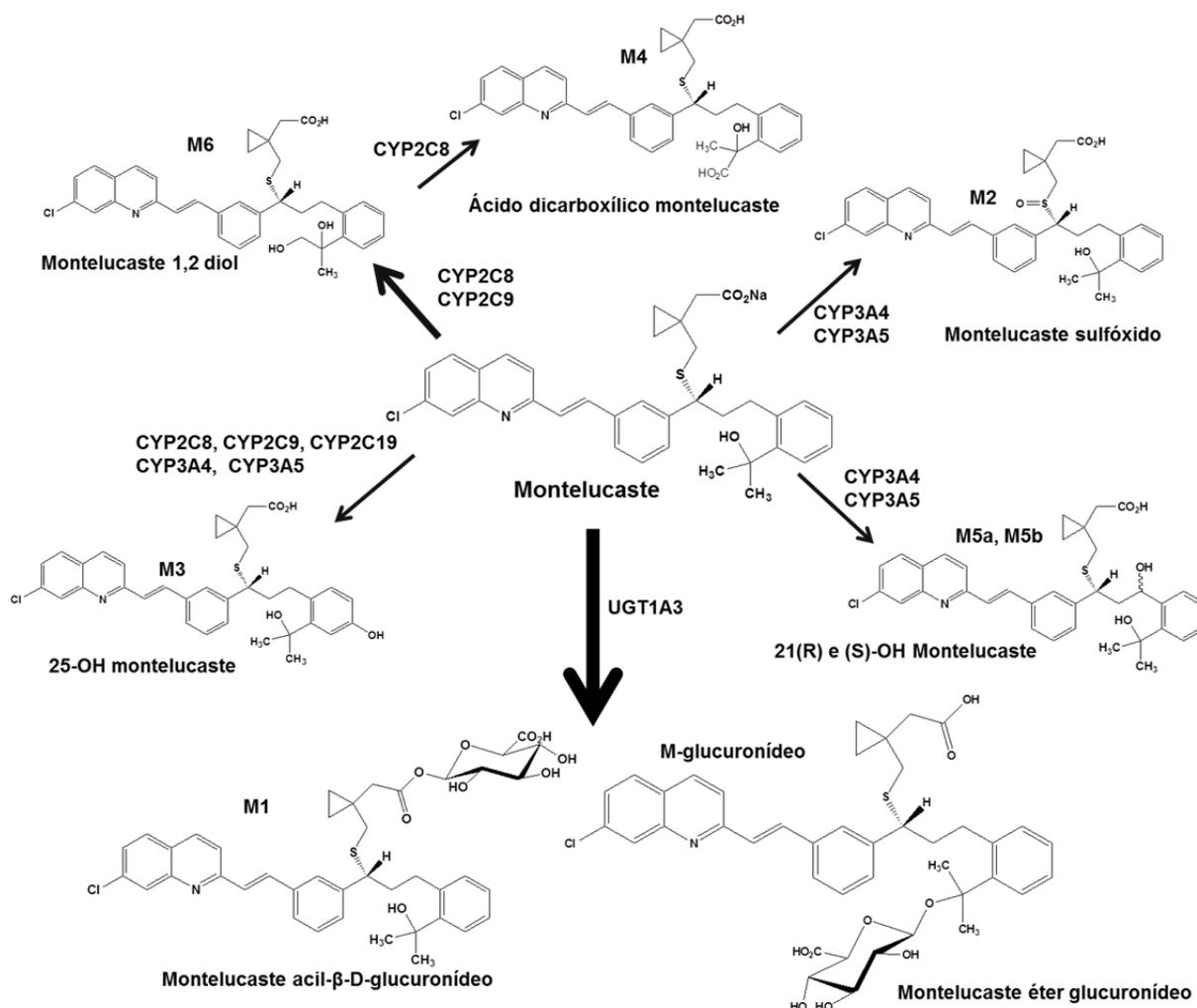


FIGURA 3.23 – Representação esquemática das rotas metabólicas do montelucaste via CYPs e UGTs e das enzimas específicas envolvidas. Proposta baseada nos dados do presente estudo e em dados da literatura.^{168,170,171}

Os resultados obtidos no presente estudo estão parcialmente de acordo com os estudos de metabolismo de montelucaste previamente descritos na literatura. Inicialmente, CHIBA et al. (1997)¹⁷¹ relataram que a formação dos metabólitos 21(R)-OH montelucaste, 21(S)-OH montelucaste e montelucaste sulfóxido é catalisada pela CYP3A4 e que a formação do metabólito montelucaste 1,2 diol é exclusivamente catalisada pela CYP2C9. Entretanto, este estudo foi realizado em concentrações relativamente elevadas de montelucaste (100 – 500 $\mu\text{mol/L}$), o que possivelmente mascarou o envolvimento da CYP2C8 na formação do montelucaste 1,2 diol. Outros relatos na literatura evidenciam o envolvimento majoritário da CYP2C8 no metabolismo *in vitro* do montelucaste, particularmente na catálise da formação do montelucaste 1,2 diol e do metabolismo secundário para a formação do ácido dicarboxílico montelucaste.^{168,169} No entanto, os dados apresentados nestas

publicações não excluem a possibilidade da participação de outras enzimas no metabolismo do montelucaste. Adicionalmente, ao contrário do presente estudo, os estudos já reportados por outros autores foram realizados utilizando isoformas de CYPs co-expressas com citocromo b5 para obtenção dos dados de decaimento e parâmetros cinéticos. Considerando o efeito do citocromo b5 na eficiência catalítica de muitas CYPs, a extrapolação dos dados obtidos neste sistema para HLMs e *in vivo* pode ser limitada. Isto ocorre, pois a presença do citocromo b5 pode inibir, estimular ou não afetar a atividade catalítica das CYPs, sendo este efeito dependente do substrato e das CYPs envolvidas nas reações metabólicas.¹⁹⁰⁻¹⁹³

Além dos estudos *in vitro*, estudos *in vivo* sugerem que a CYP2C8 é uma enzima importante na eliminação do montelucaste *in vivo* devido ao aumento de 4,3 vezes na exposição sistêmica ao montelucaste e diminuição na formação do montelucaste 1,2 diol ocasionada pela co-administração com gemfibrozil, o qual é um potente inibidor *in vivo* e *in vitro* da CYP2C8.^{167,170} Assim, os autores concluíram que a CYP2C8 é a enzima dominante no metabolismo do montelucaste em humanos, sendo responsável por 80% do *clearance*, o que levou os autores a recomendar o montelucaste como um marcador seletivo da atividade da CYP2C8 *in vivo*. No entanto, sabendo que gemfibrozil é um inibidor de várias outras enzimas metabólicas^{64,65,164,166,194} e considerando que o montelucaste é substrato para CYP2C8/CYP2C9/CY3A4, UGT1A3 (dado do presente trabalho) e para o transportador OATP2B1,¹⁹⁵ é possível que o efeito inibitório do gemfibrozil no metabolismo *in vivo* do montelucaste possa ser mediado em parte por outras vias além da inibição da CYP2C8. Está hipótese é suportada por diversos estudos, por exemplo, gemfibrozil tem sido descrito como um inibidor da glucuronidação via UGT1A1/UGT1A3 da repaglidina (*in vitro*) e sinvastatina (*in vivo/in vitro*).^{64,65} Ainda, SHITARA et al. (2004)¹⁶⁴ e NOE et al. (2007)¹⁶⁶ relatam interações medicamentosas envolvendo gemfibrozil e estatinas, devido ao efeito inibitório do gemfibrozil sobre as proteínas transportadoras OATP1B1, OATP2B1 e OATP2B3. Deste modo, a suposição de que a interação gemfibrozil-montelucaste é mediada principalmente pela CYP2C8 requer uma adicional validação usando outras abordagens, como por exemplo, o uso de outros inibidores seletivos da CYP2C8. Os resultados do presente trabalho sugerem que o montelucaste não é um marcador seletivo para a CYP2C8, pois a formação do metabólito montelucaste 1,2 diol é catalisada comparavelmente pela CYP2C8 e CYP2C9. Além disso, a formação do montelucaste

acil- β -D-glucuronídeo catalisada exclusivamente pela UGT1A3 foi observada como sendo a principal rota de eliminação do montelukaste, o que viabiliza o uso do montelukaste como um marcador seletivo da UGT1A3 *in vivo* e *in vitro*.

3.4. Conclusões

No presente estudo a caracterização detalhada e sistemática do metabolismo do montelukaste foi realizada, resultando em uma nova visão sobre as rotas metabólicas envolvidas na eliminação do montelukaste. Foi demonstrado que: **1)** o metabolismo do montelukaste é influenciado pelo tipo de solução tampão e que o metabolismo oxidativo e a glucuronidação do montelukaste são favorecidos pelas soluções tampão fosfato de sódio e tris-HCl, respectivamente; **2)** os ensaios utilizando cofatores combinados (P450s +UGTs) não são uma abordagem apropriada para avaliar a contribuição das vias metabólicas catalisadas por UGTs e CYPs no metabolismo do montelukaste; **3)** montelukaste 1,2 foi o principal metabólito oxidativo e representa 83,5% do Cl_{int} *in vitro* oxidativo total; **4)** apresentamos a primeira evidência de que embora a CYP28 esteja envolvida na formação do montelukaste 1,2 diol, a isoforma CYP2C9 está igualmente envolvida em concentrações terapeuticamente relevantes de montelukaste; **5)** CYP3A4 foi responsável pela formação dos metabólitos 21(R)-OH montelukaste e 21(S)-OH montelukaste, enquanto múltiplas CYPs catalisam a formação do metabólito 25-OH montelukaste (CYP2C8>2C9>3A4>2C19); **6)** a glucuronidação direta do montelukaste resulta na formação do montelukaste acil- β -D-glucuronídeo e de um novo metabólito (M-glucuronídeo) não reportado previamente, que parece ser consistente com o montelukaste éter glucuronídeo; **7)** a isoforma UGT1A3 catalisa exclusivamente a glucuronidação do montelukaste; **8)** a comparação do Cl_{int} *in vitro* em HLMs considerando o Cl_{int} *in vitro* aparente total (CYPs +UGTs) sugere que a glucuronidação é o principal mecanismo de eliminação do montelukaste, representando ~85% do Cl_{int} *in vitro* e que a oxidação via CYPs é o mecanismo minoritário representando somente ~15% do Cl_{int} *in vitro*, no entanto adicionais estudos clínicos para avaliar a contribuição da isoforma UGT1A3 no metabolismo *in vivo* do montelukaste são necessários; **9)** considerando a falta de marcadores seletivos para a UGT1A3, montelukaste pode ser utilizado como um marcador seletivo da UGT1A3 *in vivo* e *in vitro* e **10)** a suposição de que o principal

mecanismo de eliminação do montelucaste é a formação do montelucaste 1,2 diol e de que esta reação é seletivamente catalisada pela CYP2C8 é questionável. Portanto, o uso do montelucaste como marcador seletivo da CYP2C8 pode ser severamente comprometido, devido ao papel majoritário da UGT1A3 e o envolvimento de múltiplas CYPs no metabolismo do montelucaste.

CAPÍTULO 4

Referências Bibliográficas

1. ROSKAR, R. & LUSIN, T. T. "Analytical methods for quantification of drug metabolites in biological samples". IN: Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis. CALDERON, L. A. (Ed.). InTech, 2012. p. 79-126. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/analytical-methods-for-quantification-of-drug-metabolites-in-biological-samples>
2. WALSH, J. S. & MIWA, G. T. "Bioactivation of drugs: risk and drug design". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **51**: 145, 2011.
3. FURA, A.; SHU, Y. Z.; ZHU, M.; HANSON, R. L.; ROONGTA, V. & HUMPHREYS, W. G. "Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery". *J. Med. Chem.*, **47**: 4339, 2004.
4. LIM, Y. C.; LI, L.; DESTA, Z.; ZHAO, Q.; RAE, J. M.; FLOCKHART, D. A. & SKAAR, T. C. "Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells". *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**: 503, 2006.
5. DESTA, Z.; WARD, B. A.; SOUKHOVA, N. V. & FLOCKHART, D. A." Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6". *J pharmacol. exp. Ther.*, **310**: 1062, 2004.
6. KOSTIAINEN, R.; KOTIAHO, T.; KUURANNE, T. & AURIOLA, S. "Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies". *J. Mass Spectrom.*, **38**: 357, 2003.
7. LI, F.; GONZALEZ, F. J. & MA, X. "LC–MS-based metabolomics in profiling of drug metabolism and bioactivation". *Acta Pharm. Sin. B*, **2**: 118, 2012.
8. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília - DF, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Etudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERESA>
9. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling Recommendations. Department of Health and Human Services U.S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research Center For Biologics Evaluation and Research. Rockville, MD February 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>

10. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. European Medicines Agency: Science Medicines Health. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). London (UK), Junho, 2012. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf
11. STARIAT, J.; SESTAK, V.; VAVROVA, K.; NOBILIS, M.; KOLLAROVA, Z.; KLIMES, J.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. & KOVARIKOVA, P. "LC-MS/MS identification of the principal in vitro and in vivo phase I metabolites of the novel thiosemicarbazone anti-cancer drug, Bp4eT". Anal. Bioanal. Chem., **403**: 309, 2012.
12. EDDERSHAW, P. J. & DICKINS, M. "Advances in in vitro drug metabolism screening". Pharm. Sci. Technol., Today **2**: 13, 1999.
13. BJORNSSON, T. D.; CALLAGHAN, J. T.; EINOLF, H. J.; FISCHER, V.; GAN, L.; GRIMM, S.; KAO, J.; KING, S. P.; MIWA, G.; NI, L.; KUMAR, G.; MCLEOD, J.; OBACH, R. S.; ROBERTS, S.; ROE, A.; SHAH, A.; SNIKERIS, F.; SULLIVAN, J. T.; TWEEDIE, D.; VEGA, J. M.; WALSH, J. & WRIGHTON, S. A. "The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: A Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective". Drug Metab. Dispos., **31**: 815, 2003.
14. NASSAR, A. E. F.; TALAAT, R. E. "Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development". Drug Discov. Today, **9**: 317, 2004.
15. DESTA, Z.; SAUSSELE, T.; WARD, B.; BLIEVERNICHT, J.; LI, L.; KLEIN, K.; FLOCKHART, D. A. & ZANGER, U.M. "Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro". Pharmacogenomics, **8**: 547, 2007.
16. GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. & JOVER, R. "Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug Metabolism". Curr. Drug Metab., **4**: 292, 2003.
17. LIN, J. H. & LU, A. Y. "Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development". Pharmacol. Rev., **49**: 403, 1997.
18. EKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; MCROBIE-BELLE, D. J. & WRIGHTON, S. A. "Present and future *in vitro* approaches for drug metabolism". J. Pharmacol. Toxicol. Methods, **44**: 313, 2000.
19. ROBERTS, M. S. & ROWLAND, M. "Correlation between in-vitro microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics: analysis with a dispersion model". J. Pharm. Pharmacol., **38**: 177, 1986.
20. ROSTAMI-HODJEGAN, A. & TUCKER, G. T. "Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data". Nat. Rev. Drug Discov., **6**: 140, 2007.
21. PRAKASH, C.; SHAFFER, C. L. & NEDDERMAN, A. "Analytical strategies for identifying drug metabolites". Mass Spectrom. Rev., **26**: 340, 2007.

22. BRANDON, E. F.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H. & SCHELLENS, J. H. "An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**: 233, 2003.
23. STINGL, J. C.; BARTELS, H.; VIVIANI, R.; LEHMANN, M. L. & BROCKMOELLER, J. "Relevance of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms for drug dosing: A quantitative systematic review". *Pharmacol. Ther.*, **141**: 92, 2014.
24. GUILLEMETTE, C.; LEVESQUE, E. & ROULEAU, M. "Pharmacogenomics of Human Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferases and Clinical Implications". *Clin. Pharmacol. Ther.*, **96**: 324, 2014.
25. WIENKERS, L. C. & HEATH, T. G. "Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data". *Nat. Rev.*, **4**: 825, 2005.
26. ASHA, S. & VIDYAVATHI, M. "Role of Human Liver Microsomes in *In Vitro* Metabolism of Drugs—A Review". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**:1699, 2010.
27. LIPSCOMB, J. C. & POET, T. S. "In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling". *Pharmacol. Ther.*, **118**: 82, 2008.
28. ZHANG, D.; LUO, G.; DING, X. & LU, C. "Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development." *Acta Pharm. Sin. B*, **2**:549, 2012.
29. GUENGERICH, F. P. "Cytochrome P450 and Chemical Toxicology" *Chem. Res. Toxicol.*, **21**: 70, 2008.
30. BARANCZEWSKI, P.; STANCZAK, A.; SUNDBERG, K.; SVENSSON, R.; WALLIN, A.; JANSSON, J.; GARBERG, P. & POSTLIND, H. "Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development". *Pharmacol. Rep.*, **58**: 453, 2006.
31. NARITOMI, Y.; TERASHITA, S.; KIMURA, S.; Suzuki, A.; Kagayama, A. & SUGIYAMA, Y. "Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans". *Drug Metab. Dispos.*, **29**: 1316, 2001.
32. GEMZIK, B.; HALVORSON, M. R. & PARKINSON A. "Pronounced and differential effects of ionic strength and pH on testosterone oxidation by membrane-bound and purified forms of rat liver microsomal cytochrome P-450". *J. Steroid. Biochem.*, **35**:429, 1990.
33. SOARS, M. G.; RING, B. J. & WRIGHTON, S. A. "The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of UDP-glucuronosyltransferases". *Drug Metab. Dispos.*, **31**: 762, 2003.

34. WRIGHTON, S. A.; RING, B. J. & VANDENBRANDEN, M. "The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies". *Toxicol. Pathol.*, **23**: 199, 1995.
35. HARPER, T. W. & BRASSIL, P. J. "Reaction Phenotyping: Current Industry Efforts to Identify Enzymes Responsible for Metabolizing Drug Candidates". *The AAPS J.*, **10**: 200, 2008.
36. HASLER, J.A.; ESTABROOK, R.; MURRAY, M.; PIKULEVA, I.; WATERMAN, M.; CAPDEVILA, J.; HOLLA, V.; HELVIG, C.; FALCK, J.R.; FARRELL, G.; KAMINSKY, L.S.; SPIVACK, S.D.; BOITIER, E. & BEAUNE, P. "Human cytochromes P450". *Mol. Aspects Med.*, **20**: **1**, 1999.
37. KITTERINGHAM, N. R.; PIRMOHAMED, M. & PARK, B. K. "3 The pharmacology of the cytochrome P450 enzyme system". *Baillière's Clin. Anesthesiol.*, **12**: 191, 1998.
38. SONO, M., ROACH, M. P., COULTER, E. D. & DAWSON, J. H. "Heme-containing oxygenases". *Chem. Rev.*, **96**: 2841, 1996.
39. DONATO, M. T. & CASTELL, J. V. "Strategies and Molecular Probes to Investigate the Role of Cytochrome P450 in Drug Metabolism: Focus On *In Vitro* Studies". *Clin. Pharmacokinet.*, **42**: 153, 2003.
40. PANDEY, A. V. & FLÜCK, C. E. "NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases". *Pharmacol. Ther.*, **138**: 229, 2013.
41. ISIN, E. M. & GUENGERICH, P. "Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes". *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**: 314, 2007.
42. GUENGERICH, F. P. "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity". *Chem. Res. Toxicol.*, **14**: 616, 2001.
43. LOHMANN, W. & KARST, U. "Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations". *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**: 79, 2008.
44. INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M. & MCLELLAN, R. A. "Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment". *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**: 342, 1999.
45. PIRMOHAMED, M. & PARK, B. K. "Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions". *Toxicology* **192**: 23, 2003.
46. ZANGER, U. M. & SCHWAB, M. "Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation". *Pharmacol. Ther.*, **138**: 103, 2013.
47. CLARKE, S. E.; AYRTON, A. D. & CHENERY, R. J. "Characterization of the inhibition of P4501A2 by furafylline". *Xenobiotica*, **24**: 517, 1994.

48. JEONG, S.; WOO, M. M.; FLOCKHART, D. A. & DESTA, Z. "Inhibition of drug metabolizing cytochrome P450s by the aromatase inhibitor drug letrozole and its major oxidative metabolite 4,4'-methanol-bisbenzoxazole in vitro". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **64**: 867, 2009.
49. KINONEN, T.; PASANEN, M.; GYNTHNER, J.; POSO, A.; JÄRVINEN, T.; ALHAVA, E. & JUVONEN, R. O. "Competitive inhibition of coumarin 7-hydroxylation by pilocarpine and its interaction with mouse CYP 2A5 and human CYP 2A6". *Br. J. Pharmacol.*, **116**: 2625, 1995.
50. RAE, J. M.; SOUKHOVA, N. V.; FLOCKHART, D. A. & DESTA, Z. "Triethylenethiophosphoramidate is a specific inhibitor of cytochrome P450 2B6: implications for cyclophosphamide metabolism". *Drug Metab. Dispos.*, **30**: 525, 2002.
51. WALSKY, R. L.; OBACH, R. S.; GAMAN, E. A.; GLEESON, J. P. & PROCTOR, W. R. "Selective inhibition of human cytochrome P450 2C8 by montelukast". *Drug Metab. Dispos.*, **33**:413, 2005.
52. HRUSKA, M. W.; AMICO, J. A.; LANGAEE, T. Y.; FERRELL, R. E.; FITZGERALD, S. M. & FRYE, R. F. "The effect of trimethoprim on CYP2C8 mediated rosiglitazone metabolism in human liver microsomes and healthy subjects". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **59**: 70, 2005.
53. BALDWIN, S. J.; BLOOMER, J. C.; SMITH, G. J.; AYRTON, A. D.; CLARKE, S. E. & CHENERY, R. J. "Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9". *Xenobiotica*, **25**: 261, 1995.
54. KO, J. W.; DESTA, Z.; SOUKHOVA, N. V.; TRACY, T. & FLOCKHART, D. A. "In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **49**: 343, 2000.
55. ONO, S.; HATANAKA, T.; HOTTA, H.; SATOH, T.; GONZALEZ, F. J. & TSUTSUI M. "Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes". *Xenobiotica*, **26**: 681, 1996.
56. CHANG, T. K.; GONZALEZ, F. J. & WAXMAN, D. J. "Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450". *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**: 437, 1994.
57. MINERS, J. O. & MACKENZIE, P. I. "Drug glucuronidation in humans". *Pharmacol. Ther.*, **51**: 347, 1991.
58. OLESON, L. & COURT, M. H. "Effect of the beta-glucuronidase inhibitor saccharolactone on glucuronidation by human tissue microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferases". *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**: 1175, 2008.

59. ROWLAND, A.; MINERS, J. O. & MACKENZIE, P. I. "The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification". *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**: 1121, 2013.
60. MEECH, R. & MACKENZIE, P. I. "Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases". *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **24**: 907, 1997.
61. FISHER, M. B.; CAMPANALE, K.; ACKERMANN, B. L.; VANDENBRANDEN, M. & WRIGHTON, S. A. "In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin". *Drug Metab. Dispos.*, **28**: 560, 2000.
62. RITOV, V. B.; TVERDISLOVA, I. L.; AVAKYAN, T. YU; MENSHIKOVA, E. V.; LEIKIN, YU N.; BRATKOVSKAYA, L. B. & SHIMON, R. G. "Alamethicin-induced pore formation in biological membranes". *Gen. Physiol. Biophys.*, **11**: 49, 1992.
63. WALSKY, R. L.; BAUMAN, J. N.; BOURCIER, K.; GIDDENS, G.; LAPHAM, K.; NEGAHBAN, A.; RYDER T. F.; OBACH, R. S.; HYLAND, R. & GOOSEN, T. C. "Optimized assays for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) activities: altered alamethicin concentration and utility to screen for UGT inhibitors". *Drug Metab. Dispos.*, **40**:1051, 2012.
64. GAN, J.; CHEN, W.; SHEN, H.; GAO, L.; HONG, Y.; TIAN, Y.; LI, W.; ZHANG, Y.; TANG, Y.; ZHANG, H.; HUMPHREYS, W. G.; & RODRIGUES, A. D. "Repaglinide-gemfibrozil drug interaction: inhibition of repaglinide glucuronidation as a potential additional contributing mechanism". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **70**: 870, 2010.
65. PRUEKSARITANONT, T.; ZHAO, J. J.; MA, B.; ROADCAP, B. A.; TANG, C. Y.; QIU, Y.; LIU, L. D.; LIN, J. H.; PEARSON P. G. & BAILLIE, T. A. "Mechanistic studies on metabolic interactions between gemfibrozil and statins". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**: 1042, 2002.
66. BURCHELL, B.; LOCKLEY, D. J.; STAINES, A.; UESAWA, Y. & COUGHTRIE, M. W. "Substrate specificity of human hepatic udp-glucuronosyltransferases". *Methods Enzymol.*, **400**: 46, 2005.
67. MINERS, J. O.; KNIGHTS, K. M.; HOUSTON, J. B. & MACKENZIE, P. I. "In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises". *Biochem. Pharmacol.*, **71**: 1531, 2006.
68. COURT, M.H. "Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases". *Methods Enzymol.*, **400**: 104, 2005.
69. ZIENTEK, M. A. & YODIM, K. "Reaction Phenotyping: Advances in the experimental strategies used to characterize the contribution of drug-metabolizing enzymes". *Drug Metab. Dispos.*, **43**: 163, 2015.
70. ZHENG, Y. F.; BAE, S. H.; CHOI, E. J.; PARK, J. B.; KIM, S. O.; JANG, M. J.; PARK, G.H.; SHIN, W. G.; OH, E. & BAE, S. K. "Evaluation of the in vitro/in vivo drug interaction potential of BST204, a purified dry extract of ginseng, and its four

bioactive ginsenosides through cytochrome P450 inhibition/induction and UDP-glucuronosyltransferase inhibition". *Food Chem. Toxicol.*, **68**: 117, 2014.

71. ZHANG, D.; CHANDO, T. J.; EVERETT, D. W.; PATTEN, C. J.; DEHAL, S. S. & HUMPHREYS, W. G. "IN vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation". *Drug Metab. Dispos.*, **33**: 1729, 2005.

72. CHOUINARD, S.; TESSIER, M.; VERNOUILLET, G.; GAUTHIER, S.; LABRIE, F.; BARBIER, O. & BELANGER, A. "Inactivation of the pure antiestrogen fulvestrant and other synthetic estrogen molecules by UDP-glucuronosyltransferase 1A enzymes expressed in breast tissue". *Mol. Pharmacol.*, **69**: 908, 2006.

73. OECHSLER, S.; SKOPP, G. "An in vitro approach to estimate putative inhibition of buprenorphine and norbuprenorphine glucuronidation". *Int. J. Legal Med.* **124**: 187, 2010.

74. UCHAIPICHAT, V.; MACKENZIE, P. I.; ELLIOT, D. J. & MINERS, J. O. "Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin, phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfinpyrazone) "probes" for human UDP-glucuronosyltransferases". *Drug Metab. Dispos.*, **34**: 449, 2006.

75. JI, H. Y.; LEE, H.; LIM, S. R.; KIM, J. H. & LEE, H. S. "Effect of efavirenz on UDP-glucuronosyltransferase 1A1, 1A4, 1A6, and 1A9 activities in human liver microsomes". *Molecules*, **17**: 851, 2012.

76. KRISHNASWAMY, S.; HAO, Q.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. & COURT, M. H. "Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6". *Drug Metab. Dispos.*, **32**: 862, 2004.

77. ZHANG, Y. S.; TU, Y. Y.; GAO, X. C.; YUAN, J.; LI, G.; WANG, L.; DENG, J. P.; WANG, Q. & MA, R. M. "Strong inhibition of celastrol towards UDP-glucuronosyl transferase (UGT) 1A6 and 2B7 indicating potential risk of UGT-based herb-drug interaction". *Molecules*, **17**: 6832, 2012.

78. MURAI, T.; SAMATA, N.; IWABUCHI, H. & IKEDA, T. "Human UDP-glucuronosyltransferase, UGT1A8, glucuronidates dihydrotestosterone to a monoglucuronide and further to a structurally novel diglucuronide". *Drug Metab. Dispos.*, **34**: 1102, 2006.

79. WATANABE, Y., NAKAJIMA, M. & YOKOI, T. "Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: high catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10". *Drug Metab. Dispos.*, **30**: 1462, 2002.

80. SOARS, M. G.; PETULLO, D. M.; ECKSTEIN, J. A.; KASPER, S. C. & WRIGHTON, S. A. "An assessment of UDP-glucuronosyltransferase induction using primary human hepatocytes". *Drug Metab. Dispos.*, **32**: 140, 2004.

81. MANO, Y.; USUI, T. & KAMIMURA, H. "In vitro inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on 4-methylumbelliferone glucuronidation in recombinant human UDP- glucuronosyltransferase 1A9 - potent inhibition by niflumic acid. *Biopharm. Drug Dispos.*, **27**: 1, 2006.
82. ITAAHO, K.; COURT, M. H.; UUTELA, P.; KOSTIAINEN, R.; RADOMINSKA-PANDYA, A. & FINEL, M. "Dopamine is a low-affinity and high-specificity substrate for the human UDP-glucuronosyltransferase 1A10". *Drug Metab. Disp.*, **37**: 768, 2009.
83. COURT M. H.; KRISHNASWAMY, S.; HAO, Q.; DUAN, S. X.; PATTEN, C. J.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. "Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism". *Drug Metab. Dispos.*, **31**: 1125, 2003.
84. UCHAIPICHAT, V.; WINNER, L. K.; MACKENZIE, P. I.; ELLIOT, D. J.; WILLIAMS, J. A. & MINERS, J. O. "Quantitative prediction of *in vivo* inhibitory interactions involving glucuronidated drugs from *in vitro* data: the effect of fluconazole on zidovudine glucuronidation". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **61**: 427, 2006.
85. COURT, M. H.; DUAN, S. X.; GUILLEMETTE, C.; JOURNAULT, K.; KRISHNASWAMY, S.; VON MOLTKE, L. L. & GREENBLATT, D. J. "Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9". *Drug Metab. Dispos.*, **30**: 1257, 2002.
86. STEN, T.; FINEL, M.; ASK, B.; RANE, A. & EKSTROM, L. "Non-steroidal anti-inflammatory drugs interact with testosterone glucuronidation". *Steroids* **74**: 971, 2009.
87. MINERS, J. O.; POLASEK, T. M.; MACKENZIE, P. I. & KNIGHTS, K. M. "The In Vitro Characterization of Inhibitory Drug-Drug Interactions Involving UDP-Glucuronosyltransferase". IN: *Enzyme and Transporter Based Drug-Drug Interactions: Progress and Future Challenges*. PANG, K. S.; RODRIGUES, A. D. & PETER R. M. (Eds). New York, Springer, 2010. p. 217-236.
88. OGILVIE, B. W.; ZHANG, D.; LI, W.; RODRIGUES, A. D.; GIPSON, A. E.; HOLSAPPLE, J.; TOREN, P. & PARKINSON, A. "Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions". *Drug Metab. Dispos.*, **34**: 191, 2006.
89. RODRIGUES, A. D. "Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: Attempting to bridge the gap between CDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes". *Biochem. Pharmacol.*, **57**: 465, 1999.
90. LU, A. Y. H.; WANG, R. W. & LIN, J. H. "Cytochrome P450 *in vitro* reaction phenotyping: a re-evaluation of approaches used for P450 isoform identification". *Drug Metab. Dispos.*, **31**: 345, 2003.

91. LINDER, C. D.; RENAUD, N. A. & HUTZLER, J. M. "Is 1-Aminobenzotriazole an appropriate *in vitro* tool as a nonspecific cytochrome P450 inactivator?" *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 10, 2009.
92. KHOJASTEH, S. C.; PRABHU S.; KENNY, J. R.; HALLADAY, J. S. & LU, A. Y. H. "Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity". *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **36**: 1, 2011.
93. OBACH, R. S. "Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes". *Drug Metab. Dispos.*, **27**: 1350, 1999.
94. PARKINSON, A. "An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials". *Toxicol. Pathol.*, **24**: 45, 1996.
95. JIA, L. & LIU, X. "The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments". *Curr. Drug Metab.*, **8**: 822, 2007.
96. ARINÇ, E. "The role of polymorphic cytochrome P450 enzymes in drug design, development and drug interactions with a special emphasis on phenotyping". *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **64**: 120, 2010.
97. EKINS, S.; NIKOLSKY, Y. & NIKOLSKAYA, T. "Techniques: Application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity". *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**: 202, 2005.
98. ROSSI, D. T. & SINZ, M. *Mass Spectrometry in Drug Discovery*. 1 st ed. New York, Marcel Dekker Inc., 2001. 432 p.
99. ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. England, John Wiley & Sons, Ltd., 2003. 277p.
100. LIANG, Y.; WANG, G.; XIE, L. & SHENG, L. "Recent development in liquid chromatography/mass spectrometry and emerging technologies for metabolite identification". *Curr. Drug Metab.*, **12**: 329 2011.
101. LEE, M. S. & KERNS, E. H. "LC/MS applications in drug development". *Mass Spectrom. Rev.*, **18**: 187, 1999.
102. MA, S.; CHOWDHURY, S. K. & ALTON, K. B. "Application of mass spectrometry for metabolite identification". *Curr. Drug Metab.*, **7**: 503, 2006.
103. LAFAILLE F.; SOLASSOL, I.; ENJALBAL, C.; BERTRAND, B.; DOULAIN, P. E.; VAPPIANI, J.; BONNET, P. A.; DELEUZE-MASQUÉFA, C. & BRESSOLLE, F. M. "Structural characterization of in vitro metabolites of the new anticancer agent EAPB0503 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **88**: 429, 2014.

104. CORCORAN, O. & SPRAUL, M. "LC-NMR-MS in drug discovery". *Drug Discov. Today*, **8**: 624, 2003.
105. SUN, H. & SCOTT, D. O. "Structure-based Drug Metabolism Predictions for Drug Design". *Chem. Biol. Drug Des.*, **75**: 3, 2010.
106. EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. "LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis". *Magn. Reson. Chem.*, **43**: 681, 2005.
107. CLARKSON, C.; SIBUM, M.; MENSEN, R. & JAROSZEWSKI, J. W. "Evaluation of on-line solid-phase extraction parameters for hyphenated, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance applications". *J. Chromatogr. A*, **1165**: 1, 2007.
108. KORFMACHER, W. A. "Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery". *Drug Discov. Today*, **10**: 1357, 2005.
109. CAI, P.; TSAO, R. & RUPPEN, M. E. "In Vitro Metabolic Study of Temsirolimus: Preparation, Isolation and Identification of the Metabolites". *Drug Metab. Dispos.*, **35**: 1554, 2007.
110. KHAN, Z. P.; FERGUSON, C. N. & JONES, R. M. "Alpha-2 and imidazoline receptor agonists: Their pharmacology and therapeutic role". *Anaesthesia*, **54**: 146, 1999.
111. AFONSO, J. & REIS, F. " Dexmedetomidine: current role in anesthesia and intensive care". *Rev. Bras. Anesthesiol.*, **62**: 118, 2012.
112. LINK, R. E.; DESAI, K.; HEIN, L.; STEVENS, M. E.; CHRUSCINSKI, A.; BERNSTEIN, D.; BARSH, G. S. & KOBILKA, B. K. "Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c". *Science*, **273**: 803, 1996.
113. GERTLER, R.; BROWN, H. C.; MITCHELL, D. H. & SILVIUS, E. N. "Dexmedetomidine: a novel sedative-analgesic agent". *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)*, **14**: 13, 2001.
114. LAKHLANI, P. P.; MACMILLAN, L. B.; GUO, T. Z.; MCCOOL, B. A.; LOVINGER, D. M.; MAZE, M. & LIMBIRD L. E. "Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 9950, 1997.
115. KAMIBAYASHI, T. & MAZE, M. "Clinical uses of alpha(2)-adrenergic agonists". *Anesthesiology*, **93**: 1345, 2000.
116. PANZER, O.; MOITRA, V.; SLADEN, R. N. "Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists". *Crit. Care Clin.*, **25**: 451, 2009.

117. BHANA, N.; GOA, K. L. & McCLELLAN, K. J. "Dexmedetomidine". *Drugs*, **59**: 263, 2000.
118. TAMSEN, A. & Gordh, T. "Epidural clonidine produces analgesia". *Lancet* **2**: 231, 1984.
119. CALASANS-MAIA, J. A.; ZAPATA-SUDO, G. & SUDO, R. T. "Dexmedetomidine prolongs spinal anaesthesia induced by levobupivacaine 0.5% in guinea-pigs". *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**: 1415, 2005.
120. DEUTSCH, E. & TOBIAS, J. D. "Hemodynamic and respiratory changes following dexmedetomidine administration during general anesthesia: sevoflurane vs desflurane". *Pediatr. Anaesth.*, **17**: 438, 2007.
121. CHRYSOSTOMOU, C. & SCHMITT, C. G. "Dexmedetomidine: sedation, analgesia and beyond". *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **4**: 619, 2008.
122. RUAN, X. "Drug-related side effects of long-term intrathecal morphine therapy". *Pain Physician*, **10**: 357, 2007.
123. DEUTSCH, E. & TOBIAS, J. D. "Hemodynamic and respiratory changes following dexmedetomidine administration during general anesthesia: sevoflurane vs desflurane". *Pediatr. Anaesth.*, **17**: 438, 2007.
124. LOOMIS, C. W.; MILNE, B. & CERVENKO, F. W. "A study of the interaction between clonidine and morphine on analgesia and blood-pressure during continuous intrathecal infusion in the rat". *Neuropharmacology*, **27**: 191, 1988.
125. OSSIPOV, M. H.; SUAREZ L. J. & SPAULDING, T. C. "Antinociceptive interactions between alpha2-adrenergic and opiate agonists at the spinal level in rodents". *Anaesth. Analg.*, **68**: 194, 1989.
126. SALMENPERÄ, M. T.; SZLAM, F. & HUG, C. C. Jr. "Anesthetic and hemodynamic interactions of dexmedetomidine and fentanyl in dogs". *Anesthesiology*, **80**: 837, 1994.
127. ENGELMAN, E. & MARSALA, C. "Efficacy of adding clonidine to intrathecal morphine in acute postoperative pain: meta-analysis". *Br. J. Anaesth.*, **110**: 21, 2013.
128. AGARWAL, S.; AGGARWAL, R. & GUPTA, P. "Dexmedetomidine prolongs the effect of bupivacaine in supraclavicular brachial plexus block". *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, **30**: 36, 2014.
129. SUDO, R. T.; CALASANS-MAIA, J. A.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A.; ZAPATA-SUDO, G.; HERNANDES, M. Z. & PITTA, I. R. "Interaction of morphine with a new alpha(2)-adrenoceptor agonist in mice". *J. Pain*, **11**: 71, 2010.
130. CARDOSO, J. O.; VENANCIO, T.; PECCININI, R. G.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; OLIVEIRA, R. V. "Semi-Preparative LC-UV Method for Purification of Compounds by Stacked Injections" In: 39th International Symposium on High-

Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam-Netherlands, 2013.

131. BELAZ, K. R. & OLIVEIRA, R. V. "HPLC-fluorescence determination of EROD activity in wistar rat liver microsomes obtained by two different extraction procedures". *Curr. Pharm. Anal.*, **9**: 43, 2013.

132. BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, **72**: 248, 1976.

133. KRUGER, N. J. "The Bradford method for protein quantitation." IN: *The Protein Protocols Handbook*. Walker J.M. (Ed.), Totowa, Human Press, 2002. p. 15-21.

134. ZHANG, Z. & MITRA, K. "Application of accurate mass spectrometry for metabolite identification". IN: *ADME-enabling technologies in drug design and development*. ZHANG, D. & SURAPANENI, S. (Eds.). New York, John Wiley & Sons, 2012. p. 317-330.

135. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. "Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria". Campinas-SP, Editora da Unicamp, 2001. p. 412.

136. MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M. & de KANTER, R. "Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction". *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2**: 875, 2006.

137. NICHOLSON, J. K.; CONNELLY, J.; LINDON, J. C.; & HOLMES, E. "Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function". *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**: 153, 2002.

138. CLAESSENS, A. J.; RISLER, L. J.; EYAL, S.; SHEN, D. D.; EASTERLING, T. R. & HEBERT, M. F. "CYP2D6 mediates 4-hydroxylation of clonidine in vitro: implication for pregnancy-induced changes in clonidine clearance". *Drug Metab. Dispos.*, **38**: 1393, 2010.

139. JONES, T. R.; METTERS, K. & EVANS, A. J. "Preclinical pharmacological studies with montelukast (Singulair), a selective cysteinyl leukotriene receptor(CysLT1) antagonist". *Clin. Exp. Allergy Rev.*, **1**: 205, 2001.

140. DE LEPELEIRE I.; REISS, T. F.; ROCHETTE, F.; BOTTO, A.; ZHANG, J.; KUNDU, S. & DECRAMER, M. "Montelukast causes prolonged, potent leukotriene D4-receptor antagonism in the airways of patients with asthma". *Clin. Pharmacol. Ther.*, **61**: 83, 1997.

141. NOONAN, M. J.; CHERVINSKY, P.; BRANDON, M.; ZHANG, J.; KUNDU, S.; MCBURNEY, J. & REISS, T. F. "Montelukast, a potent leukotriene receptor antagonist, causes dose-related improvements in chronic asthma. Montelukast asthma study group". *Eur. Respir. J.*, **11**: 1232, 1998.

142. Singular label Merck & Co., Inc. Montelukast prescribing information. Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2015.
143. KNORR, B.; MATZ, J.; BERNSTEIN, A.; NGUYEN, H.; SEIDENBERG, B. C.; REISS, T. F. & BECKER, A. "Montelukast for chronic asthma in 6-to-14-year old children: a randomized, double-blind trial. Pediatric montelukast study group". *JAMA*; **279**: 1181, 1998.
144. KNORR, B.; FRANCHI, L. M.; BISGAARD, H.; VERMEULEN, J. H.; LESOUEF, P.; SANTANELLO, N.; MICHELE, T. M.; REISS, T. F.; NGUYEN, H. H. & BRATTON, D. L. "Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of persistent asthma in children aged 2 to 5 years". *Pediatrics*, **108**: E48, 2001.
145. REISS, T. F.; SORKNESS, C. A.; STRICKER, W.; BOTTO, A.; BUSSE, W. W.; KUNDU, S. & ZHANG, J. "Effects of montelukast (MK-0476); a potent cysteinyl leukotriene receptor antagonist, on bronchodilation in asthmatic subjects treated with and without inhaled corticosteroids". *Thorax*, **52**: 45, 1997.
146. LAVIOLETTE, M.; MALMSTROM, K.; LU, S.; CHERVINSKY, P.; PUJET, J. C.; PESZEK, I.; ZHANG, J. & REISS, T. F. "Montelukast added to inhaled beclomethasone in treatment of asthma. Montelukast/beclomethasone additivity group". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **160**: 1862, 1999.
147. VAQUERIZO, M. J.; CASAN, P.; CASTILLO, J.; PERPIÑA, M.; SANCHIS, J.; SOBRADILLO, V.; VALENCIA, A.; VERA, H.; VIEJO, J. L.; VILLASANTE, C.; GONZALEZ-ESTEBAN, J. & PICADO, C. "Effect of montelukast added to inhaled budesonide on control of mild to moderate asthma". *Thorax*, **58**: 204, 2003.
148. LEIGH, R.; VETHANAYAGAM, D.; YOSHIDA, M.; WATSON, R. M.; RERECICH, T.; INMAN, M. D. & O'BYRNE, P. M. "Effect of montelukast and budesonide on airway responses and airway inflammation in asthma". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **166**: 1212, 2002.
149. RAISSY, H. H.; HARKINS, M.; KELLY, F. & KELLY, H. W. "Pretreatment with albuterol versus montelukast for exercise-induced bronchospasm in children". *Pharmacotherapy*, **28**: 287, 2008.
150. VILLARAN, C.; O'NEILL, S. J.; HELBLING, A.; VAN NOORD, J. A.; LEE, T. H.; CHUCHALIN, A. G.; LANGLEY, S. J.; GUNAWARDENA, K. A.; SUSKOVIC, S.; LAURENZI, M.; JASAN, J.; MENTEN, J. & LEFF, J. A. "Montelukast versus salmeterol in patients with asthma and exercise-induced bronchoconstriction. Montelukast/salmeterol exercise study group". *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**: 547, 1999.
151. BORDERIAS, L.; MINCEWICZ, G.; PAGGIARO, P. L.; GUILERA, M.; SAZONOV KOCEVAR, V.; TAYLOR, S. D. & BADIA, X. "Asthma control in patients with asthma and allergic rhinitis receiving add-on montelukast therapy for 12 months: a retrospective observational study". *Curr. Med. Res. Opin.*, **23**: 721, 2007.
152. PHILIP, G.; NAYAK, A. S.; BERGER, W. E.; LEYNADIER, F.; VRIJENS, F.; DASS, S. B. & REISS, T. F. "The effect of montelukast on rhinitis symptoms in

patients with asthma and seasonal allergic rhinitis". *Curr. Med. Res. Opin.*, **20**: 1549, 2004.

153. PETERS-GOLDEN, M.; SWERN, A.; BIRD, S. S.; HUSTAD, C. M.; GRANT, E. & EDELMAN, J. M. "Influence of body mass index on the response to asthma controller agents". *Eur. Respir. J.*, **27**: 495, 2006.

154. LAZARUS, S. C.; CHINCHILLI, V. M.; ROLLINGS, N. J.; BOUSHEY, H. A.; CHERNIACK, R.; CRAIG, T. J.; DEYKIN, A.; DIMANGO, E.; FISH, J. E.; FORD, J. G.; ISRAEL, E.; KILEY, J.; KRAFT, M.; LEMANSKE, R. F. JR.; LEONE, F. T.; MARTIN, R. J.; PESOLA, G. R.; PETERS, S. P.; SORKNESS, C. A.; SZEFLER, S. J.; WECHSLER, M. E. & FAHY, J. V. "Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **175**: 783, 2007.

155. DAHLÉN, S. E.; MALMSTRÖM, K.; NIZANKOWSKA, E.; DAHLÉN, B.; KUNA, P.; KOWALSKI, M.; LUMRY, W. R.; PICADO, C.; STEVENSON D. D.; BOUSQUET, J.; PAUWELS, R.; HOLGATE, S. T.; SHAHANE, A.; ZHANG, J.; REISS, T. F. & SZCZEKLIK, A. "Improvement of aspirin-intolerant asthma by montelukast, a leukotriene antagonist: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165**: 9, 2002.

156. HAN, J.; JIA, Y.; TAKEDA, K.; SHIRAIISHI, Y.; OKAMOTO, M.; DAKHAMA, A. & GELFAND, E. W. "Montelukast during primary infection prevents airway hyperresponsiveness and inflammation following re-infection with respiratory syncytial virus". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **182**: 455, 2010.

157. BISGAARD, H. "Randomized trial of montelukast in respiratory syncytial virus postbronchiolitis". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**: 379, 2003.

158. ZHAO, J. J.; ROGERS, J. D.; HOLLAND, S. D.; LARSON, P.; AMIN, R. D.; HAESSEN, R.; FREEMAN, A.; SEIBERLING, M.; MERZ, M. & CHENG, H. "Pharmacokinetics and bioavailability of montelukast sodium (MK-0476) in healthy young and elderly volunteers". *Biopharm. Drug Dispos.*, **18**:769, 1997.

159. BALANI, S. K.; XU, X.; PRATHA, V.; KOSS, M. A.; AMIN, R. D.; DUFRESNE, C.; MILLER, R. R.; ARISON, B. H.; DOSS, G. A.; CHIBA, M.; FREEMAN, A.; HOLLAND, S. D.; SCHWARTZ, J. I.; LASSETER, K. C.; GERTZ, B. J.; ISENBERG, J. I.; ROGERS, J. D.; LIN, J. H. & BAILLIE, T. A. "Metabolic profiles of montelukast sodium (Singulair), a potent cysteinyl leukotriene₁ receptor antagonist, in human plasma and bile". *Drug Metab. Dispos.*, **25**: 1282, 1997.

160. KIM, K. A.; PARK, P. W.; KIM, K. R. & PARK, J. Y. "Effect of multiple doses of montelukast on the pharmacokinetics of rosiglitazone, a CYP2C8 substrate in humans". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **63**: 339, 2007.

161. JAAKKOLA, T.; BACKMAN, J. T.; NEUVONEN, M.; NIEMI, M. & NEUVONEN, P. J. "Montelukast and zafirlukast do not affect the pharmacokinetics of the CYP2C8 substrate pioglitazone". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **62**: 503, 2006.

162. KAJOSAARI, L. I.; NIEMI, M.; BACKMAN, J. T. & NEUVONEN, P. J. "Telithromycin, but not montelukast, increases the plasma concentrations and effects of the cytochrome P450 3A4 and 2C8 substrate repaglinide". *Clin. Pharmacol. Ther.*, **79**: 231, 2006.
163. HEGAZY, S. K.; MABROUK, M. M.; ELSISI, A. E. & MANSOUR, N. O. "Effect of clarithromycin and fluconazole on the pharmacokinetics of montelukast in human volunteers". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **68**: 1275, 2012.
164. SHITARA, Y.; HIRANO, M.; SATO, H. & SUGIYAMA Y. "Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**: 228, 2004.
165. BACKMAN, J. T.; HONKALAMMI, J.; NEUVONEN, M.; KURKINEN, K. J.; TORNIO, A.; NIEMI, M. & NEUVONEN, P. J. "CYP2C8 activity recovers within 96 hours after gemfibrozil dosing: estimation of CYP2C8 half-life using repaglinide as an in vivo probe". *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 2359, 2009.
166. NOÉ, J.; PORTMANN, R.; BRUN, M. E. & FUNK, C. "Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3". *Drug Metab. Dispos.*, **35**: 1308, 2007.
167. KARONEN, T.; NEUVONEN, P. J. & BACKMAN, J. T. "CYP2C8 but not CYP3A4 is important in the pharmacokinetics of montelukast". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **73**: 257, 2012.
168. FILPPULA, A. M.; LAITILA, J.; NEUVONEN, P. J. & BACKMAN, J. T. "Reevaluation of the microsomal metabolism of montelukast: major contribution by CYP2C8 at clinically relevant concentrations". *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 904, 2011.
169. VANDENBRINK, B. M.; FOTI, R. S.; ROCK, D. A.; WIENKERS, L. C. & WAHLSTROM, J. L. "Evaluation of CYP2C8 inhibition in vitro: utility of montelukast as a selective CYP2C8 probe substrate". *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 1546, 2011.
170. KARONEN, T.; FILPPULA, A.; LAITILA, J.; NIEMI, M.; NEUVONEN, P. J. & BACKMAN, J. T. "Gemfibrozil markedly increases the plasma concentrations of montelukast: a previously unrecognized role for CYP2C8 in the metabolism of montelukast". *Clin. Pharmacol. Ther.*, **88**: 223, 2010.
171. CHIBA, M.; XU, X.; NISHIME, J. A.; BALANI, S. K. & LIN, J. H. "Hepatic microsomal metabolism of montelukast, a potent leukotriene D4 receptor antagonist, in humans". *Drug Metab. Dispos.*, **25**: 1022, 1997.
172. SCHOCH, G. A.; YANO, J. K.; SANSEN, S.; DANSETTE, P. M.; STOUT, C. D. & JOHNSON, E. F. "Determinants of cytochrome P4502C8 substrate binding - Structures of complexes with montelukast, troglitazone, felodipine, and 9-cis-retinoic acid". *J. Biol. Chem.*, **283**: 17227, 2008.

173. KILFORD, P. J.; STRINGER, R.; SOHAL, B.; HOUSTON, J. B. & GALETIN, A. "Prediction of drug clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes". *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 82, 2009.
174. BHARATHI, D. V.; HOTHATHA, K. K.; JAGADEESH, B.; MULLANGI, R. & NAIDU, A. "Quantification of montelukast, a selective cysteinyl leukotriene receptor (CysLT1) antagonist in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: validation and its application to a human pharmacokinetic study". *Biomed. Chromatogr.*, **23**: 804, 2009.
175. ROBINSON, R. A. & MACASKILL J. B. "Osmotic coefficients of aqueous sodium carbonate solutions at 25°C". *J. Solution Chem.*, **8**: 35, 1979.
176. SCHRAG, M. L. & WIENKERS, L. C. "Topological alteration of the CYP3A4 active site by the divalent cation Mg(2+)". *Drug Metab. Dispos.*, **28**: 1198, 2000.
177. BOASE, S. & MINERS, J. O. "In vitro–in vivo correlations for drugs eliminated by glucuronidation: Investigations with the model substrate zidovudine". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **54**: 493, 2002.
178. MÄENPÄÄ, J.; HALL, S. D.; RING, B. J.; STROM, S. C. & WRIGHTON, S. A. "Human cytochrome P450 3A (CYP3A) mediated midazolam metabolism: the effect of assay conditions and regioselective stimulation by alpha-naphthoflavone, terfenadine and testosterone". *Pharmacogenetics*, **8**: 137, 1998.
179. OBACH, R. S. & REED-HAGEN, A. E. "Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach". *Drug Metab. Dispos.*, **30**: 831, 2002.
180. HOUSTON, J. B. "Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance". *Biochem. Pharmacol.*, **47**: 1469, 1994.
181. MOHUTSKY, M.; CHIEN, J.; RING, B. & WRIGHTON, S. "Predictions of the in vivo clearance of drugs from rate of loss using human liver microsomes for phase I and phase II biotransformations". *Pharmacol. Res.* **23**: 654, 2006.
182. YAMAZAKI, H.; UENG, Y. F.; SHIMADA, T. & GUENGERICH, F. P. "Roles of divalent metal ions in oxidations catalyzed by recombinant cytochrome P450 3A4 and replacement of NADPH-cytochrome P450 reductase with other flavoproteins, ferredoxin, and oxygen surrogates". *Biochemistry*, **34**: 8380, 1995.
183. KAIVOSAARI, S.; TOIVONEN, P.; AITIO, O.; SIPILÄ, J.; KOSKINEN, M.; SALONEN, J. S. & FINEL, M. "Regio- and stereospecific N-glucuronidation of medetomidine: the differences between UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 and UGT2B10 account for the complex kinetics of human liver microsomes". *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 1529, 2008.
184. SHET, M. S.; FISHER, C. W.; HOLMANS, P. L. & ESTABROOK, R. W. "Human cytochrome P450 3A4: enzymatic properties of a purified recombinant

fusion protein containing NADPH-P450 reductase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **90**: 11748, 1993.

185. KEMP, D. C.; FAN, P. W. & STEVENS, J. C. "Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance". Drug Metab. Dispos., **30**: 694, 2002.

186. VEAL, G. J. & BACK, D. J. "Metabolism of Zidovudine". Gen. Pharmacol., **26**: 1469, 1995.

187. WANG, B. Drug-Drug Interactions in Pharmaceutical Development. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 255.

188. TRONTELJ, J. "Quantification of Glucuronide Metabolites in Biological Matrices by LC-MS/MS". IN: Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. JEEVAN, P. (Ed.). InTech, 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-andprinciples/quantification-of-glucuronide-metabolites-in-biological-matrices-by-lc-ms-ms>

189. FAED, E. M. "Properties of acyl glucuronides: implications for studies of the pharmacokinetics and metabolism of acidic drug". Drug Metab. Rev., **15**: 1213, 1984.

190. PORTER, T. D. "The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions". J. Biochem. Mol. Toxicol., **16**: 311, 2002.

191. SCHENKMAN, J. B. & JANSSON, I. "The many roles of cytochrome b5". Pharmacol. Ther., **97**: 139, 2003.

192. REED, J. R. & HOLLENBERG, P. F. "Examining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b5: the effect of cytochrome b5 on the interaction between cytochrome P450 2B4 and P450 reductase". J. Inorg. Biochem., **97**: 265, 2003.

193. IM, S. C. & WASKELL, L. "The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5)". Arch. Biochem. Biophys., **507**: 144, 2011.

194. WEN, X.; WANG, J. S.; BACKMAN, J. T.; KIVISTO, K.T. & NEUVONEN, P. J. "Gemfibrozil is a potent inhibitor of human cytochrome P4502C9". Drug Metab. Dispos., **29**: 1359, 2001.

195. MOUGEY, E. B.; FENG, H.; CASTRO, M.; IRVIN, C. G. & LIMA, J. J. "Absorption of montelukast is transporter mediated: a common variant of OATP2B1 is associated with reduced plasma concentrations and poor response". Pharmacogenet. Genomics, **19**: 129, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A1: Características dos HLMs utilizados nos ensaios para análises de correlação, onde o conteúdo total de P450s, oxidoredutases e a atividade de cada isoforma estão listadas de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante (BD Gentest)

Lot No.	Total P450 ^a	Cyt c Red ^b	Cyt b ₅	Atividade Enzimática (pmol/(mgxmin))									
				CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4	CYP4A11
HH623	120	180	320	350	290	16	97	3000	6,5	47	1000	3200	1700
HH855	230	210	560	670	120	27	150	5800	95	190	3400	5200	3700
HH524	120	390	560	840	660	79	60	3200	17	110	2400	6800	1700
HH867	440	240	440	1000	400	79	400	3100	43	74	3100	4100	2500
HH757	100	190	320	30	80	20	42	600	2,7	79	1700	1300	820
HH189	300	250	420	230	1200	48	210	4100	270	37	2500	13600	1800
HH837	400	290	260	880	1900	110	310	3900	100	91	1700	13700	2100
HMC552	320	500	680	1100	370	7	430	5300	40	6	3800	4200	1400
HH40-1	260	250	680	530	300	3	51	3400	4	9	1800	2800	1300
6177	340	260	540	710	1200	52	71	3100	65	66	2700	6100	1200
23418	330	200	420	700	1300	79	82	2000	41	110	1200	3200	1300
65910	410	370	510	540	1100	77	180	2700	52	120	2200	6200	1500
3043885	340	630	460	800	1100	47	44	3900	41	29	1400	4100	1300
7407	480	240	520	530	1400	57	160	3300	75	71	2500	7600	1400

Cyt b₅: Cytochrome b₅ (pmol/mg); a: pmol P450/mg de proteína total; b: pmol/(mgxmin).