

Oliveira F<sup>1,2</sup>; Aranha L<sup>1</sup>; Graça A<sup>1</sup>; Simplicio AL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa;

<sup>2</sup> Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica/Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa

## Introdução

- O interesse crescente no estudo das carboxilesterases (CES) deve-se ao seu importante papel no metabolismo de fármacos e pró-fármacos, em especial no campo da oncologia.<sup>1-7</sup>
- Os métodos convencionais apresentam limitações na avaliação da actividade específica das diferentes isoformas (CES-1 ou CES-2) em amostras complexas.<sup>8</sup>
- A microanálise electromediada (EMMA) tem sido utilizada com sucesso em ensaios de actividade enzimática, estudos cinéticos e estudo de inibidores<sup>9,10,11</sup>, mas nunca para avaliação de carboxilesterases.

## Objectivo

Desenvolver uma metodologia de EMMA para avaliar a actividade de CES em amostras biológicas complexas.

## Metodologia

Isoenzimas: CES-1 e hCES-2, testadas de forma isolada e em mistura

Substrato: acetato de 4-metilumbeliferil (4-MUBA)

Inibidores: Fosfato de bis-p-nitrofenil (BNPP) (inibidor irreversível de CES); Loperamida (inibidor selectivo das hCES-2)<sup>8</sup>

Sistema de electroforese capilar detector UV, corrente 70 µA x 6 min, migração catódica.

Ensaio repetido 3 vezes. Hidrólise espontânea do 4-MUBA monitorizada em ensaios controlo.

## Resultados

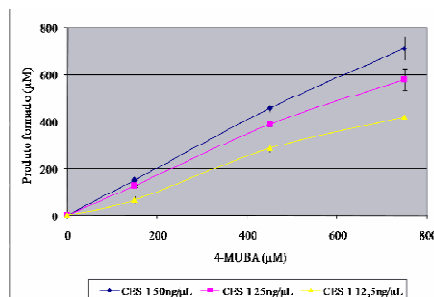


Figura 1-Formação do produto (4-MUB) na presença de diferentes concentrações de substrato (4-MUBA) e de CES-1 (dados mostram a média obtida com três corridas realizadas para cada ensaio; barras pretas representam o desvio padrão).

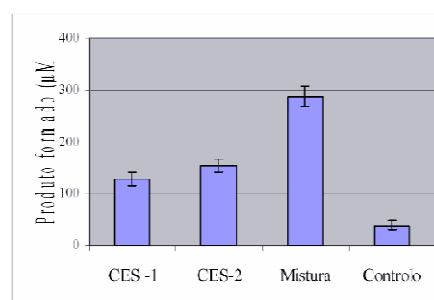


Figura 2 - Formação do produto (4-MUB) a partir de 5 mM de 4-MUBA na presença de CES isoladas (hCES-2 vs. 5 ng/mL de CES-1) e mistura (hCES-2 e 5 ng/mL de CES-1) (dados mostram a média obtida com três corridas realizadas para cada ensaio; barras pretas representam o desvio padrão).

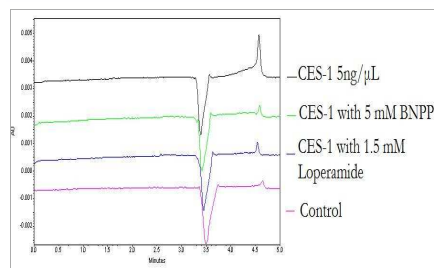


Figura 3 - Electroferogramas obtidos com a metodologia EMMA com 5 ng/µL de CES-1 e com a adição de 5 mM de BNPP e 1.5 mM de loperamida.

- Verificou-se uma relação linear entre as concentrações de produto formado e as concentrações de CES-1 e 4-MUBA utilizadas (Fig. 1).
- Para uma mesma concentração de substrato (4-MUBA), a actividade catalítica das CES misturadas corresponde à soma das actividades isoladas de cada CES individualmente (Fig. 2).
- A utilização de 5mM de BNPP leva à inibição total da actividade da CES-1, mas não da hCES-2. As concentrações de loperamida utilizadas para produzir a inibição total da actividade da hCES-2 (dados não mostrados) interferem na actividade da CES-1 (Fig. 3).
- Os resultados sugerem que a hCES-2 possui uma cinética de inibição diferente da CES-1, tendo o tempo de contacto entre a hCES-2 e os inibidores utilizado no método sido insuficiente para produzir a sua inibição.

## Considerações finais

- ✓ Foi desenvolvida, com sucesso, uma metodologia EMMA rápida, fiável, de fácil execução e com baixo consumo de amostras, adequada para a avaliação da actividade da CES-1. A inibição por completo a actividade da hCES-2 requer estudos futuros.
- ✓ O desenvolvimento do método implicou a optimização de parâmetros como a ordem de adição dos reagentes e a solubilidade do 4-MUBA.
- ✓ Os resultados obtidos revelam a possibilidade de ocorrência de falsos negativos mesmo quando se garante o total contacto dos inibidores com as enzimas.