

RELATÓRIO FINAL

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1 EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

Estudo nº: 024-ERG-023-19

Patrocinador: **Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações - MCTIC**

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília - DF

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO	4
RESUMO E CONCLUSÃO	5
DATAS.....	6
1. OBJETIVO DO ESTUDO	6
2. EQUIPE DE PROJETO.....	6
3. ITEM DE TESTE, ITEM DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	6
3.1 Caracterização do Item de Teste.....	6
3.2 Caracterização do Item de Referência.....	7
3.3 Caracterização de Reagentes e Solventes	7
3.4 Caracterização do veículo	9
3.5 Preparo do Item de Teste, do Item de Referência e do Veículo.....	9
3.6 Justificativa para a seleção das concentrações do Item de Teste e do Item de Referência.....	9
3.7 Seleção das concentrações do Item de Teste	9
4. SISTEMA TESTE.....	9
4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	9
4.2 Obtenção do Sistema Teste	10
4.3 Manutenção do Sistema Teste	10
5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	10
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	11
6.1 Desenho experimental.....	11
6.1.1 Desenho experimental para a avaliação da possível interação do Item de Teste com o canal hERG.....	11
6.2 Metodologia.....	11
6.2.1 Avaliação da inibição do canal de potássio dependente de voltagem do tipo hERG	11
6.3 Grupos experimentais	12
6.4 Análise estatística.....	12
7. RESULTADOS.....	12
7.1 Avaliação da inibição do canal de potássio.....	12
8. CONCLUSÃO DO ESTUDO	14
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	14
10. ARQUIVAMENTO	14
11. REFERÊNCIAS	14

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1
EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

11.1 Referências Internas	14
11.2 Normativas	15
11.3 Literatura	15
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	16
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DO DIRETOR PRESIDENTE	17

Confidencial

RESUMO E CONCLUSÃO

Os canais de potássio dependem de voltagem do tipo hERG (*human ether-a-go-go-related*) são essenciais para a atividade elétrica normal no coração. A disfunção do canal hERG pode causar síndrome do QT longo (SQTL), caracterizada por retardo na repolarização e prolongamento do intervalo QT do potencial de ação da célula cardíaca, o que aumenta o risco de arritmias ventriculares e de morte súbita. Assim, compostos que atuam nesse canal e que possivelmente causem síndrome do QT longo têm sido eliminados precocemente no processo de desenvolvimento não clínico em testes de segurança (Sanguinetti & Tistani-Firouzi, 2006). O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da fosfoetanolamina (ST-024) sobre o canal hERG *in vitro*, utilizando a linhagem de células HEK-293 transfectadas com o canal hERG humano. Para isso, foram utilizadas as concentrações de 0,1 – 10 μM da fosfoetanolamina, enquanto que o controle positivo dofetilide, um potente e seletivo inibidor do canal hERG, foi incubado nas concentrações de 0,003 – 3 μM . Ambos os compostos foram mantidos por 30 minutos em contato com as células. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a fosfoetanolamina não inibiu o canal hERG, nas concentrações avaliadas, diferente do dofetilide, o qual apresentou inibição proporcional a concentração usada com uma CI_{50} de 0,012 (0,0027 - 0,0515) μM . Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a fosfoetanolamina (ST-024), até a concentração de 10 μM , não inibe os canais de hERG.

DATAS

Data do início do estudo: 25/03/2019

Data proposta para o início do experimento: 08/04/2019

Data proposta para o término do experimento: 17/07/2019

Data proposta para o término do estudo: 24/07/2019

1. OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar se a fosfoetanolamina (ST-024) tem potencial de causar inibição sobre o canal de potássio Kv11.1 hERG (*Human Ether-a-go-go Related Gene Potassium Channel*), em células HEK-293 transfectadas com o canal hERG humano.

2. EQUIPE DE PROJETO

Camila Guimarães Moreira, PhD	Diretora de Estudo
Patrícia de Oliveira Benedet, PhD	Bolsista de Pós-Doutorado
Rodrigo Marcon, PhD	Pesquisador

3. ITEM DE TESTE, ITEM DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

3.1 Caracterização do Item de Teste

Nome	: O-Fosforiletanolamina, Fosfoetanolamina
Nome químico (IUPAC)	: 2-Aminoetanol-O-fosfato
Número do CAS	: 1071-23-4
Lote	: BCBQ7961V
Data de fabricação	: 11/09/2015
Data de validade	: 31/07/2021
Pureza/ Composição	: > 98 %
Estabilidade	: Não informada
Aspectos físicos	: Cristal branco
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Identificação CIEnP	: ST-024.8

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1 EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

3.2 Caracterização do Item de Referência

Nome	:	Dofetilide
Nome químico (IUPAC)	:	1-(4-methanesulfonamidophenoxy)-2-(N-(4-methanesulfonamidophenethyl)-N-methylamine)ethane
Número do CAS	:	Será informado no Relatório Final
Lote	:	0000013681
Data de fabricação	:	07/07/2014
Data de validade	:	07/07/2020
Pureza/ Composição	:	98 %
Estabilidade	:	Não informada
Aspectos físicos	:	Sólido
Fabricante	:	Sigma-Aldrich
Identificação CIEnP	:	SR-94

3.3 Caracterização de Reagentes e Solventes

Nome	:	Azul de tripan
Lote	:	1627965
Data de validade	:	Não informada
Fabricante	:	Life Technologies
Nome	:	Dimetilsulfóxido (DMSO)
Lote	:	37666
Data de validade	:	07/12/2019
Fabricante	:	Neon
Nome	:	L-Glutamina
Lote	:	RNBG6730
Data de validade	:	03/2020
Fabricante	:	Sigma-Aldrich
Nome	:	Meio MEM
Lote	:	RNBH0703
Data de validade	:	04/2020
Fabricante	:	Sigma-Aldrich

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1
EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

Nome : Geneticina
Lote : 11811-023/1874963
Data de validade : 09/2019
Fabricante : Gibco

Nome : Piruvato de sódio
Lote : RNBG6181
Data de validade : 02/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Soro fetal bovino
Lote : 17H165
Data de validade : 31/07/2022
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Tampão PBS
Lote : 70420014
Data de validade : 24/04/2022
Fabricante : Laborclin

Nome : Tripsina-EDTA 10 x
Lote : SLBW3937
Data de validade : 07/2019
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Kit FLIPR Potassium Assay
Lote : 3036833
Data de validade : Não informado
Fabricante : Molecular Devices

Nome : Probenecida
Lote : 120M015
Data de validade : 30/06/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

3.4 Caracterização do veículo

Nome	:	Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) livre de cálcio e magnésio
Lote	:	RNBG8343
Data de validade	:	06/2020
Fabricante	:	Sigma-Aldrich

3.5 Preparo do Item de Teste, do Item de Referência e do Veículo

A solubilização do Item de Teste foi feita em HBSS livre de cálcio e magnésio e a solubilização do Item de Referência em DMSO 100 %, ambos na concentração de 10 mM. As concentrações de uso do Item de Teste (0,1 a 10 μ M) e do Item de Referência (0,003 a 3 μ M) foram preparadas em HBSS livre de cálcio e magnésio.

3.6 Justificativa para a seleção das concentrações do Item de Teste e do Item de Referência

As concentrações do Item de Teste e Item de Referência foram selecionadas de acordo com dados da literatura (Huang *et al.*, 2010; Dorn *et al.*, 2005).

3.7 Seleção das concentrações do Item de Teste

As concentrações selecionadas para o Item de Teste (ST-024) foram de 0,1 a 10 μ M.

4. SISTEMA TESTE

Linhagem	:	Linhagem celular HEK-293 transfectada com o canal hERG (Kv11.1)
Tipo celular	:	Recombinant HEK-293 cell line expressing human ERG
Espécie de origem	:	<i>Homo sapiens</i> , human
Tecido de origem	:	Human Embryonic Kidney
Propriedades	:	Aderente
Lote	:	1708142A4
Fabricante	:	BPS Bioscience

4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

Os canais de potássio hERG (*Human Ether-à-go-go Related Gene Potassium Channel*) são essenciais para a atividade elétrica fisiológica das células cardíacas. A disfunção do canal hERG pode causar síndrome do QT longo (SQTL), caracterizada por retardo na repolarização e prolongamento do intervalo QT do potencial de ação da célula cardíaca, o que aumenta o risco de arritmias ventriculares e morte súbita. Este efeito colateral

é uma razão comum para a falha de drogas em testes de segurança não clínica (Sanguinetti & Tistani-Firouzi, 2006).

4.2 Obtenção do Sistema Teste

A linhagem celular HEK-293 recombinante para a expressão do gene humano hERG (Kv11.1) foi adquirida da empresa *BPS Bioscience*. Para o uso no presente estudo, as células foram descongeladas e cultivadas de acordo com as especificações do fornecedor: hERG (Kv11.1) – HEK-293 Recombinant Cell line Cat #: 60619 *product sheet*. Em seguida, as células foram utilizadas nos ensaios, como descrito no item 9.2 (Metodologia).

4.3 Manutenção do Sistema Teste

As células foram mantidas em garrafas contendo meio de cultura suplementado, em incubadora de CO₂, a 37 ± 0,2 °C e com 5 ± 0,2 % de CO₂, até o momento dos ensaios.

5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Visando reduzir, ao máximo, possíveis desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados os critérios propostos pelo guia de boas práticas em cultura celular (Coecke et al., 2005) e pelo guia de boas práticas de laboratório INMETRO-NIT-DICLA (035 a 041) – versão atual. Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento até a realização dos experimentos: 1) O projeto foi conduzido conforme descrito no POP B.06; 2) O Plano de Estudo foi descrito conforme o POP B.02; 3) O Relatório Final foi descrito conforme o POP B.05; 4) Todos os reagentes foram recebidos e armazenados no CIEnP, conforme descrito no POP G.01, e foram utilizados dentro do prazo de validade indicado pelo fabricante; 5) Nenhum dado bruto foi omitido para o cálculo das médias, análise estatística e/ou análise de resultados; 6) Todos os dados brutos gerados foram pronta e imediatamente registrados em documento específico pelo pessoal responsável pela condução do estudo, conforme descrito no POP B.03; 7) Os experimentos, quando aplicável, foram realizados de forma cega (ex. o experimentador não tinha conhecimento sobre o tratamento dos grupos experimentais); 8) A análise estatística dos dados foi determinada no planejamento dos experimentos, e tomou-se por base a distribuição gaussiana dos dados, sendo utilizado avaliações paramétricos.

6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

6.1 Desenho experimental

6.1.1 Desenho experimental para a avaliação da possível interação do Item de Teste com o canal hERG



Figura 1: Desenho experimental. As células transfectadas com o canal hERG foram plaqueadas e mantidas em condições controladas até a confluência. Em seguida, foram incubadas com a sonda por 1 hora antes da adição dos tratamentos (30 minutos). Após o tempo de incubação com as diferentes concentrações dos tratamentos, foi realizada a leitura no equipamento FlexStation 3.

6.2 Metodologia

6.2.1 Avaliação da inibição do canal de potássio dependente de voltagem do tipo hERG

Os estudos que visam avaliar a inibição do canal de potássio hERG, tradicionalmente são executados através de ensaios de eletrofisiologia, utilizando a técnica de *patch clamp*, a qual é considerada padrão-ouro para estudos de canais iônicos; porém, outras metodologias têm sido desenvolvidas a fim de avaliar o influxo de íons através de canais iônicos transfectados em células imortalizadas. Uma dessas metodologias consiste na utilização do *kit* comercial denominado *FLIPR® Potassium Assay*, cada vez mais utilizado para a avaliação e triagem rápida e robusta de compostos sobre canais iônicos, como o canal hERG (Yu *et al.*, 2016). O método utilizado neste ensaio baseou-se na permeabilidade dos canais de potássio hERG ao composto tálio, um componente presente no *kit* comercial *FLIPR® Potassium Assay*. Quando os canais de potássio hERG são abertos por um estímulo, o influxo de tálio do meio externo é detectado por um corante indicador altamente sensível. O sinal fluorogênico reflete quantitativamente a atividade de canais iônicos hERG que são permeantes ao tálio. Os resultados de validação da metodologia utilizando o *FLIPR® Potassium Assay*, quando comparada aos estudos de eletrofisiologia, demonstraram que as duas metodologia produzem resultados equivalentes sobre o canal hERG (Zou *et al.*, 2010; Potet *et al.*, 2012). Sendo assim, para avaliação da interação com o hERG, foi utilizado o *kit* comercial *FLIPR® Potassium Assay (Molecular Devices)* e o ensaio foi realizado conforme as especificações do fabricante. Para isso, após o descongelamento das células HEK-293 transfectadas com o hERG humano, as mesmas foram plaqueadas na densidade de 4×10^4 células por poço em uma placa de 96 poços preta de fundo chato e transparente. Após a confluência das células, o meio de cultura da placa foi aspirado e substituído por 50 μ L de HBSS livre de cálcio e magnésio. Em seguida, as células foram incubadas com 50 μ L da sonda fluorescente presente

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1 EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

no *kit* comercial, contendo probenecida na concentração final de 2,5 mM. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente e no escuro, foram acrescentados aos poços 25 µL dos tratamentos com a fosfoetanolamina (0,1 – 10 µM) ou com o dofetilide (0,003 – 3 µM), e a placa foi novamente incubada por 30 minutos. O tampão de estímulo previamente otimizado (50 µL de tálio 1 mM + potássio 10 mM) foi adicionado a cada coluna através de pipetagem automatizada presente no equipamento FlexStation 3. O sinal foi adquirido em intervalos de 1,52 segundos por aproximadamente 140 segundos por coluna. Os dados foram obtidos através do *Software SoftMax® Pro*, no comprimento de onda de excitação em 485 nm e comprimento de onda de emissão em 538 nm. A análise de dados foi realizada usando *SoftMax Pro Software* e *GraphPad Prism® 8*. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do canal hERG e a concentração inibitória (CI₅₀) foi calculada através de regressão linear. O protocolo foi realizado de acordo com o POP D.17/01.

6.3 Grupos experimentais

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, concentrações e tempo de incubação por grupo experimental			
Grupos experimentais	Veículo	Item de Teste	Item de Referência
Tratamento	HBSS	ST-024.8	Dofetilide
Incubação	30 minutos		
Concentrações	-	0,1 – 10 µM	0,003 – 3 µM
Sistema Teste	hERG (Kv11.1) – HEK-293		
Número experimental	3		

6.4 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism® 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A CI₅₀ foi avaliada através da regressão linear dos dados gerados a partir dos valores de intensidade de fluorescência. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) da porcentagem de inibição relativa do canal *versus* a concentração utilizada.

7. RESULTADOS

7.1 Avaliação da inibição do canal de potássio

Para o ensaio de inibição do canal de hERG, foram utilizadas as concentrações de fosfoetanolamina de 0,1 a 10 µM, enquanto que para o dofetilide (Item de Referência), foi utilizado as concentrações de 0,003 a 3 µM. Conforme pode ser observado na figura 2, a

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1 EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

fosfoetanolamina incubada nas células em concentrações que excedem as observadas em plasma humano quando administrada pela via oral, não foi capaz de alterar a permeação do potássio pelo canal hERG. Por outro lado, para o dofetilide, um potente e seletivo inibidor do canal hERG (Dorn *et al.*, 2005), foi observado que os valores de concentração inibitória 50 % (CI₅₀) e o intervalo de confiança obtidos foram de 0,012 (0,0027 - 0,0515) µM, indicando a inibição do canal hERG de forma dependente da concentração.

Tabela 2. Valores de CI ₅₀ e intervalo de confiança (95%)	
Compostos	CI ₅₀
Item de Teste (ST-024)	Maior que 10 µM
Item de Referência (Dofetilide)	0,012 (0,0027 - 0,0515) µM

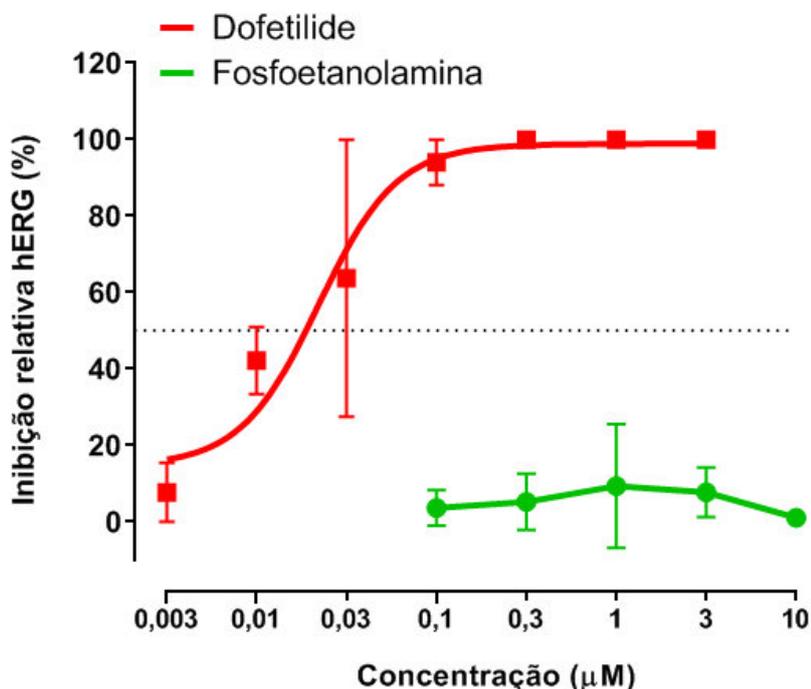


Figura 2: Curva concentração-resposta para a fosfoetanolamina e para o dofetilide sobre o canal hERG. As células HEK-293 transfectadas com o hERG foram incubadas com a fosfoetanolamina (0,1 – 10 µM; ST-024) ou com o Item de Referência (0,003 – 3 µM; Dofetilide) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada solução de Tálcio 1 mM + Potássio 10 mM através de pipetagem automatizada presente no equipamento FlexStation 3. Os dados foram obtidos utilizando o Software SoftMax® Pro (excitação 485 nm, emissão 538 nm). O sinal foi adquirido em intervalos de 1,52 segundos por aproximadamente 140 segundos por coluna em uma placa de 96 poços. O gráfico representa a inibição relativa do canal hERG (em %) após incubação com a fosfoetanolamina (ST-024) ou após

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1 EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

incubação com o Item de Referência (Dofetilide). A análise de dados foi realizada usando SoftMax Pro Software e GraphPad Prism® 8. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do canal hERG e os dados no gráfico foram expressos como média ± erro padrão da média de 3 ensaios distintos.

8. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a fosfoetanolamina (ST-024), até a concentração de 10 µM, não inibe os canais de hERG.

9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados em formulário e/ou planilhas adequadas.

10. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original dos Dados Brutos e Relatório Final será arquivada por, no mínimo, 5 anos no CIEnP.

11. REFERÊNCIAS

11.1 Referências Internas

POP-B02/versão atual: Elaboração, auditoria e aprovação do Plano de Estudo;
POP-B05/versão atual: Elaboração, auditoria e aprovação e arquivo do Relatório Final;
POP-B06/versão atual: Condução do Estudo;
POP-B07/versão atual: Arquivo, recuperação e disposição de documentos;
POP-B08/versão atual: Elaboração, preenchimento e Arquivo da Agenda Mestra;
POP-C01/versão atual: Balança Analítica Shimadzu - Modelo AUY220;
POP-C02/versão atual: Pipetas automáticas;
POP-C03/versão atual: Balança semi-analítica Shimadzu modelo BL 3200 – H;
POP-C34/versão atual: Balança Ultra micro;
POP-C36/versão atual: Vórtex modelo 772 Fisatom;
POP-C50/versão atual: Refrigerador Duplex Brastemp RM42EBBNA40;
POP-C52/versão atual: Osmose Reversa;
POP-C60/versão atual: Termo higrômetro - Modelo 7663.02.0.00;
POP-D17/versão atual: Avaliação da inibição do canal de potássio (hERG);
POP-F13/versão atual: Descarte de materiais contaminantes (Resíduos);
POP-G01/versão atual: Recebimento de Materiais – Geral.

11.2 Normativas

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Altern Lab Anim.* Jun;33(3):261-87; 2005.

INMETRO – NIT – DICLA- 035 a 041 (versões atuais), “Boas Práticas de Laboratório – BPL”.

11.3 Literatura

Dorn A, Hermann F, Ebneith A, Bothmann H, Trube G, Christensen K, Apfel C. Evaluation of a High-Throughput Fluorescence Assay Method for hERG Potassium Channel Inhibition. *Journal of Biomolecular Screening* 10(4); 2005.

Huang X-P, Mangano T, Hufeisen S, Setola V, Roth BL. Identification of human Ether-à-go-go related gene modulators by three screening platforms in an academic drug-discovery settings. *Assay and Drug Development Technologies* 8(6); 2010.

Potet F, Lorinc AN, Chaigne S, *et al.* Identification and Characterization of a Compound That Protects Cardiac Tissue from Human Ether-à-go-go-related Gene (hERG)-related Drug-induced Arrhythmias. *J Biol Chem.* 287(47): 39613–39625, 2012.

Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature.* 23;440(7083):463-9, 2006.

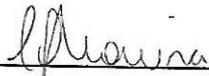
Yu H, Li M, Wang W, Wang X. High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol Sin.* 37(1): 34–43, 2016.

Zou B, Yu H, Babcock JJ, Chanda P, Bader JS, McManus OB, Li M. Profiling diverse compounds by flux- and electrophysiology-based primary screens for inhibition of human Ether-à-go-go related gene potassium channels. *Assay Drug Dev Technol.* 8(6):743-54, 2010.

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1
EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL hERG HUMANO.

DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos.



Dra. Camila Guimarães Moreira

Diretora do Estudo

23/07/19

Data

Confidencial

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA COM O CANAL DE POTÁSSIO Kv11.1
EM CELÚLAS HEK293 TRANSFECTADAS COM O CANAL HERG HUMANO.

DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DO DIRETOR PRESIDENTE

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.



Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

23/07/19

Data



Dr. João Batista Calixto
Diretor Presidente

23/07/19

Data

Confidencial