

RELATÓRIO FINAL

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA
FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.**

Estudo nº: 024-PER-042-19

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, ITENS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES ...	6
3.1 Caracterização do Item de Teste.....	6
3.2 Caracterização dos Itens de Referência	7
3.3 Caracterização de Reagentes e Solventes	7
3.4 Caracterização do veículo	10
3.5 Preparo do Item de Teste e dos Itens de Referência.....	10
3.6 Seleção e justificativa para a seleção das concentrações do Item de Teste e dos Itens de Referência.....	11
4. SISTEMA TESTE.....	11
4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	11
4.2 Obtenção do Sistema Teste	11
4.3 Manutenção do Sistema Teste	12
5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	12
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	13
6.1 Desenho experimental.....	13
6.1.1 Avaliação da permeabilidade	13
6.2 Metodologia.....	13
6.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico	13
6.2.2 Avaliação da integridade da monocamada celular	18
6.2.3 Ensaio de permeabilidade.....	19
6.3 Grupos experimentais	19
6.4 Análise estatística.....	20
7. RESULTADOS.....	20
7.1 Validação do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para a quantificação da ST-024.8	20
7.2 Avaliação da integridade da monocamada celular através da TEER e da permeabilidade do <i>Lucifer Yellow</i>	21
7.3 Controles experimentais	22

7.4 Determinação da Permeabilidade Aparente (P_{app}) da ST-024.8 utilizando o modelo <i>Transwell</i> com células Caco-2	25
8. CONCLUSÃO DO ESTUDO	26
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	26
10. ARQUIVAMENTO	26
11. REFERÊNCIAS	26
11.1 Referências Internas	26
11.2 Normativas	27
11.3 Literatura	27
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	29
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DO DIRETOR PRESIDENTE	30

Confidencial

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

Número do Estudo

024-PER-042-19

Patrocinador

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI

Telefone: +55 (61) 2033-7500
Esplanada dos Ministérios, Bloco E
Brasília – DF
CEP 70067-900

Instalação de Teste

Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Telefone: 48 32612856
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302, Florianópolis, SC, Brasil
CEP 88056-000

Diretor Presidente

Dr. João Batista Calixto

Telefone: 48 32612856
E-mail: joao.calixto@cienp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Gerente da Instalação
de Teste

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior

Telefone: 48 32612856
E-mail: jarbas.siqueira@cienp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Diretora de Estudo

Dra. Camila Guimarães Moreira

Telefone: 48 32612856
E-mail: camila.moreira@cienp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Unidade da Garantia
da Qualidade

Tiago da Silva

Telefone: 48 32612856
E-mail: tiago.silva@cienp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

RESUMO E CONCLUSÃO

As células da linhagem Caco-2, (linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano) quando cultivadas em condições específicas, formam uma monocamada confluenta composta por células com características morfológicas e funcionais semelhantes às dos enterócitos humanos. Essas células são cultivadas em placas de cultura especiais para a montagem de um sistema útil para o estudo da permeabilidade e transporte intestinal de compostos. Esse modelo é um dos mais utilizados para a predição de permeabilidade intestinal em humanos, principalmente pelo fato de as células Caco-2 expressarem transportadores que têm afinidade por substratos e atividade similares às aquelas *in vivo*. Sendo assim, este modelo foi empregado para o estudo de permeabilidade do Item de Teste fosfoetanolamina (ST-024.8) e para a determinação de sua Permeabilidade aparente (P_{app}), parâmetro utilizado para estimar a permeabilidade intestinal de compostos *in vivo*. A quantificação da fosfoetanolamina foi feita através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), juntamente com a validação parcial de um método analítico, o qual foi previamente validado para a quantificação do Item de Teste 024.8 em plasma de ratos (estudo 021-DVM-020-15). Os parâmetros obtidos apresentaram-se de acordo com o recomendado para a validação de métodos analíticos. Nesse estudo de permeabilidade, a proporção do Item de Teste ST-024.8 que permeou a monocamada de células Caco-2 foi inferior ao limite de detecção estabelecido para o método analítico utilizado. Sendo assim, isso qualifica o Item de Teste 024.8 como um composto de baixa permeabilidade, visto que a P_{app} foi classificada como $< 2 \times 10^{-6}$ cm/s. Os dados obtidos *in vitro* sugerem que a fosfoetanolamina apresenta baixa permeabilidade intestinal, levando, conseqüentemente, a uma baixa absorção oral *in vivo*.

DATAS

Data do início do estudo: 18/04/2019

Data proposta para o início do experimento: 18/05/2019

Data proposta para o término do experimento: 22/07/2019

Data proposta para o término do estudo: 30/07/2019

1. OBJETIVO DO ESTUDO

- 1 - Determinar a permeabilidade aparente (P_{app}) da fosfoetanolamina (ST-024.8) em cultura de células CACO-2;
- 2 - Fazer a quantificação por LC-MS e classificar a fosfoetanolamina quanto a sua permeabilidade.

2. EQUIPE DE PROJETO

Camila Guimarães Moreira, PhD	Diretora de Estudo
Clarissa Feltrin, PhD	Bolsista de Pós-Doutorado
Melina Heller, PhD	Pesquisadora

3. ITEM DE TESTE, ITENS 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

3.2 Caracterização dos Itens de Referência

Nome	: Clorotiazida
Nome químico (IUPAC)	: 6-chloro-1,1-dioxo-4H-1λ6,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide
Número do CAS	: 58-94-6
Lote	: LRAA8998
Data de fabricação	: 08/09/2015
Data de validade	: 31/12/2020
Pureza/ Composição	: ≥ 98 %
Estabilidade	: Não informada
Aspectos físicos	: Sólido
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Identificação CIEnP	: SR-136

Nome	: Propranolol
Nome químico (IUPAC)	: (RS)-1-(isopropylamino)-3-(naphthalen-1-yloxy)propan-2-ol
Número do CAS	: 525-66-6
Lote	: BCBQ4523V
Data de fabricação	: Não informado
Data de validade	: 12/06/2020
Pureza/ Composição	: ≥ 99 %
Estabilidade	: Não informada
Aspectos físicos	: Pó branco
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Identificação CIEnP	: SR-157

3.3 Caracterização de Reagentes e Solventes

Nome	: Acetato de amônio
Lote	: BCBR6599V
Data de validade	: 29/01/2020
Fabricante	: Sigma-Aldrich

Nome	: Acetonitrila
Lote	: JA077030
Data de validade	: 30/11/2021

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

Fabricante : Merck

Nome : Ácido fórmico

Lote : Z0529202

Data de validade : 31/08/2021

Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Ácido MES

Lote : SLBZ3485

Data de validade : 30/12/2020

Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Aminoácidos não-essenciais

Lote : RNBG5598

Data de validade : 28/02/2014

Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Azul de tripan

Lote : 1627965

Data de validade : Não informada

Fabricante : Life Technologies

Nome : Bicarbonato de sódio

Lote : BCBX0795

Data de validade : 20/04/2023

Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Dimetilsulfóxido (DMSO)

Lote : 37666

Data de validade : 07/12/2019

Fabricante : Neon

Nome : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Lote : 2004655

Data de validade : 30/04/2021

Fabricante : Gibco

Nome : Etanol

Lote : 1810092410

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

Data de validade : 09/10/2024
Fabricante : Êxodo Científica

Nome : Fosfetanolamina (O-Phosphoethanolamine)
Lote : BCB157961V
Data de validade : Não informada
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Hank's balanced salt solution
Lote : RNBG8343
Data de validade : 06/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : HEPES
Lote : SLBW7244
Data de validade : 16/01/2022
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Isotiocianato de fenila (PITC)
Lote : BCBL8662V
Data de validade : 04/11/2019
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : L-Glutamina
Lote : RNBH436
Data de validade : 03/2021
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Lucifer Yellow
Lote : MKCB0271V
Data de validade : 04/10/2022
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Metanol
Lote : 10969907
Data de validade : 31/08/2021
Fabricante : Merck

Nome : Penicilina-estreptomicina
Lote : 087M4870V

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

Data de validade : 08/2019
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Piridina
Lote : SHBG8498V
Data de validade : 21/06/2022
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 : Trietilamina
Lote : SHBF7579
Data de validade : 09/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

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

3.4 Caracterização do veículo

Nome : Hank's balanced salt solution
Lote : RNBG8343
Data de validade : 06/2020
Fabricante : Sigma-Aldrich

3.5 Preparo do Item de Teste e dos Itens de Referência

O Item de Teste ST-024.8 foi solubilizado em água deionizada (10 mM), com diluições posteriores em tampão HBSS até a concentração de uso (50 µM). Os Itens de Referência clorotiazida (SR-136) e propranolol (SR-157) foram previamente solubilizados em DMSO

(dimetilsulfóxido), na concentração inicial de 10 mM, com diluições posteriores em tampão HBSS até a concentração de uso (10 µM). Tanto a solubilização quanto as diluições foram efetuadas em condições estéreis em cabine de segurança biológica.

3.6 Seleção e justificativa para a seleção das concentrações do Item de Teste e dos Itens de Referência

A concentração de fosfoetanolamina (50 µM) foi escolhida com base na sensibilidade do método analítico desenvolvido (através de LC-MS) e por não alterar a integridade da monocamada de células Caco-2 ao longo de todo o ensaio. A concentração dos Itens de Referência clorotiazida (SR-136) e propranolol (SR-157) foi determinada a partir de dados da literatura (Wang *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001).

4. SISTEMA TESTE

Linagem	:	Adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2)
Espécie de origem	:	<i>Homo sapiens, human</i>
Propriedades	:	Aderente
Fabricante	:	<i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>

4.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

As células da linhagem Caco-2, quando cultivadas em condições específicas, formam uma monocamada confluenta composta por células com características morfológicas e funcionais semelhantes às dos enterócitos humanos. Essas células são cultivadas em placas de cultura especiais para a montagem de um sistema útil no estudo da permeabilidade intestinal de compostos bioativos (Li, 2001). Esse modelo é um dos mais utilizados para a predição de permeabilidade intestinal em humanos, principalmente porque as células Caco-2 expressam transportadores que têm afinidade por substratos e atividade similares àquelas *in vivo* (Awortwe *et al.*, 2014; Li, 2001).

4.2 Obtenção do Sistema Teste

A linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) foi adquirida do Banco de Células ATCC (*American Type Culture Collection*).

4.3 Manutenção do Sistema Teste

As células foram cultivadas e mantidas a $37 \pm 0,5$ °C e $5 \pm 0,2$ % em incubadora de CO₂, em garrafas de 75 cm² contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB), 1 % de L-glutamina e 1 % de aminoácidos não essenciais até a subconfluência máxima de 80 %. Posteriormente, as células foram subcultivadas em insertos do tipo *Transwell® Permeable Support*, Corning e mantidas em incubadora de CO₂ por 24-25 dias até o momento do ensaio. Nos insertos, as células foram mantidas em meio suplementado, conforme descrito previamente, acrescido de 1 % de antibiótico (10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina). O meio de cultura foi substituído por meio fresco a cada 2-3 dias, tanto durante o cultivo nas garrafas como durante a manutenção nos insertos.

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 Avaliação da permeabilidade

Avaliação da permeabilidade

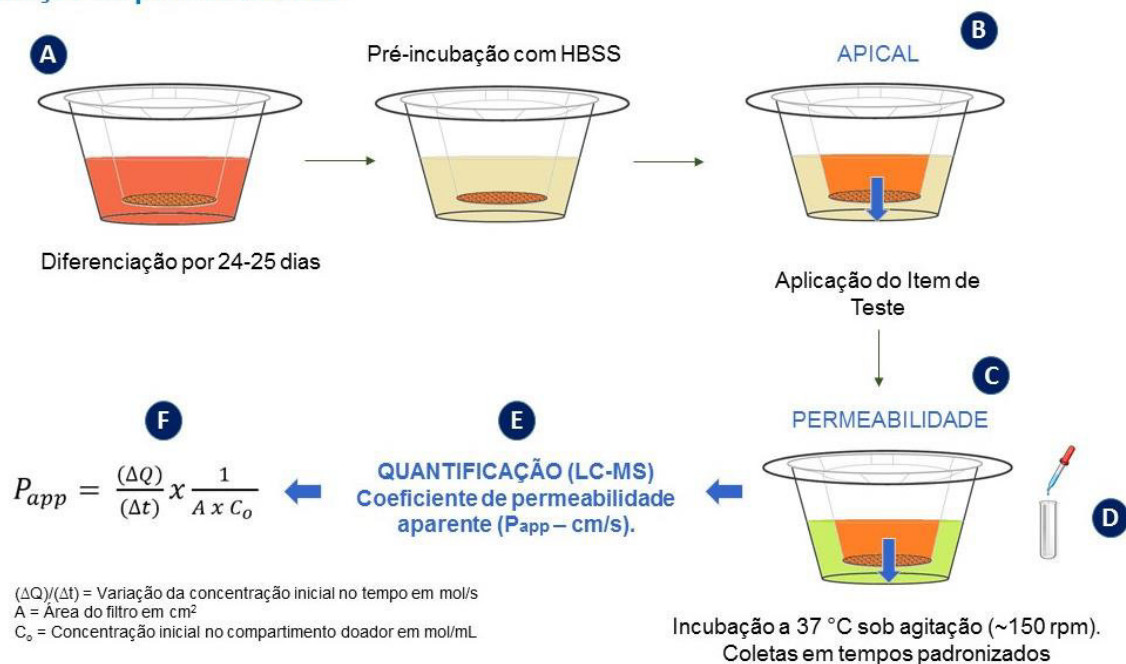


Figura 1: Desenho experimental. (A) As células da linhagem Caco-2 foram mantidas por 24-25 dias em insertos até sua diferenciação. (B) Após, foi feita a pré-incubação com HBSS com (C) posterior aplicação do Item de Teste (50 μ M) ou Itens de Referência (10 μ M), os quais foram mantidos incubados a 37 °C, sob agitação constante. (D) Foram coletadas amostras para (E) quantificação através de LC-MS e (F) determinação da permeabilidade aparente (P_{app}).

6.2 Metodologia

6.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

O método analítico por LC-MS utilizado foi o mesmo descrito no Relatório Final do estudo 021-DVM-020-15 – “Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da fosfoetanolamina sintética produzida pela USP-São Carlos e a fosfoetanolamina padrão Sigma em plasma de rato”. Todo o processo de validação foi efetuado com a fosfoetanolamina (padrão analítico), obtida da empresa Sigma-Aldrich. Para a validação, foram determinados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. O

procedimento de análise seguiu as recomendações da RDC 166 de 24 de julho de 2017, a qual estabelece critérios para a validação de métodos analíticos (Brasil, 2017).

6.2.2.1 Determinação da linearidade

Para a determinação da linearidade foram efetuadas 3 curvas independentes, com 5 concentrações nominais distintas na faixa de 0,75 -15 µM, as quais foram preparadas a partir de uma solução mãe a 1 mM em água deionizada ou em tampão HBSS (*Hank's balanced salt solution*). As curvas preparadas em água foram diretamente submetidas ao procedimento de derivatização, enquanto que as curvas preparadas em HBSS foram primeiramente diluídas em água deionizada na proporção 1:5 para posterior submissão à derivatização.

6.2.2.2 Determinação da precisão intra e inter ensaio

A precisão intra e inter ensaio foi determinada através do preparo de três replicatas dos controles de qualidade CQB (controle de qualidade de baixa concentração) = 2,25 µM, CQM (controle de qualidade de concentração intermediária) = 7,5 µM e CQA (controle de qualidade de alta concentração) = 12,5 µM em água deionizada e em HBSS. A resposta avaliada para ambos ensaios foi a área do pico cromatográfico para o Item de Teste e os resultados foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%).

6.2.2.3 Determinação da exatidão do método

A exatidão do método foi avaliada utilizando os mesmos controles empregados para a verificação da precisão; entretanto, cada uma das nove determinações teve a sua concentração real calculada com base na curva de calibração em HBSS. O resultado da exatidão do método analítico foi expresso como o desvio em % *bias* do valor da concentração nominal, o qual foi calculado utilizando a equação abaixo (Equação 1).

Equação 1. % bias = $((x_i - x) / x) \times 100$

Xi: Concentração experimental

X: Valor de concentração nominal da determinação.

6.2.2.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido como o menor ponto da curva de calibração.

6.2.2.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado pela relação sinal-ruído.

6.2.2.6 Preparo das amostras

As amostras utilizadas para a validação do método analítico, bem como as alíquotas obtidas nos ensaios de permeabilidade foram submetidas ao procedimento de derivatização. As soluções mãe foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em água deionizada. Todas as amostras foram solubilizadas no momento do preparo das soluções para a validação da metodologia analítica. A partir da solução mãe foram produzidas soluções de trabalho na concentração de 1 mM em HBSS ou em água deionizada, utilizadas para a avaliação da linearidade (0,75 -15 μ M) e dos parâmetros analíticos de precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. Todas as soluções foram devidamente documentadas, rotuladas e armazenadas a uma temperatura de, aproximadamente, 4 °C (geladeira) durante o período do estudo. As amostras em HBSS utilizadas na validação e as resultantes do ensaio de permeabilidade foram diluídas na proporção de 1:5 em água deionizada. Posteriormente, 10 μ L de cada amostra foram usados para o processo de derivatização. A derivatização foi efetuada utilizando 100 μ L de solução de acoplamento, composta por acetonitrila: piridina: trietilamina: etanol (10:5:2:3) e 5 μ L de PITC (Isotiocianato de fenila). As amostras foram agitadas por 1 min, incubadas a 60 °C por 10 minutos, agitadas novamente por aproximadamente 30 segundos e incubadas a - 20 °C por 5 minutos. Logo após, as amostras foram submetidas à quantificação por LC-MS. Conforme descrito no estudo 021-DVM-020-15, o procedimento de derivatização utilizado permite a obtenção de uma porcentagem de conversão de 88 % de fosfoetanolamina em feniltiocarbamil-fosfoetanolamina, composto monitorado por espectrometria de massas para a quantificação do analito (Figura 2).

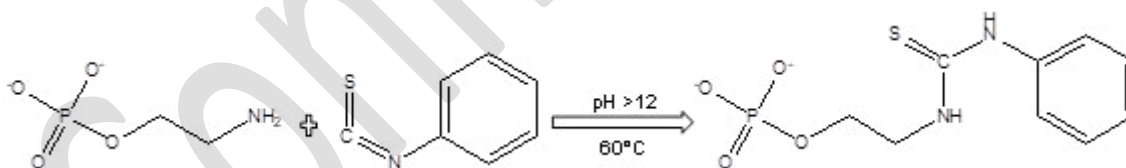


Figura 2. Reação de derivatização da fosfoetanolamina com PITC em feniltiocarbamil-fosfoetanolamina.

6.2.2.7 Equipamento

Para a quantificação do Item de Teste 024.8 foi utilizado o sistema cromatográfico de ultra eficiência Acquity Ultra Performace H-Class equipado com desgaseificador, sistema de bombas quaternário, forno para coluna cromatográfica, amostrador com controle de temperatura e injetor automático (Waters). A detecção dos analitos usados no estudo foi realizada com o detector de espectrometria de massas Xevo TQS com analisador de massas

tipo triploquadrupolo (Waters) equipado com fonte de ionização de elétrons Z-spray (ESI) (Waters).

6.2.2.8 Parâmetros cromatográficos e espectrométricos

Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna de fase reversa C18 (Acquity UPLC® BEH C18 5,0 cm x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters). Os solventes constituintes da fase móvel foram: acetato de amônio 10 mM em água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em modo de eluição por gradiente linear. Para a separação cromatográfica foi aplicado inicialmente 95% de A e 5% de B até 1,0 min seguido pelo gradiente linear de 5 - 95% de B até 2,0 min e manutenção a 95% de B até 3,0 min. Posteriormente, foi efetuado o reequilíbrio da coluna até 5 min. A taxa de fluxo da fase móvel foi 0,2 mL/min e o volume de injeção 1,00 µL. A temperatura do forno foi mantida a 30 °C e a temperatura do amostrador a 10 °C.

Nitrogênio foi empregado como gás nebulizante (vazão de 150 L/hora) e gás secante (vazão de 1.100 L/hora). A tensão do capilar foi ajustada para 3.000 V, a temperatura da fonte para 550 °C e a vazão do gás de colisão (argônio) para 0,15 mL/min. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o programa MassLynx, versão 4.1. As transições adotadas para as quantificações da ST-024.8 e dos demais analitos e informações adicionais sobre os métodos estão dispostas no Quadro 1.

Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna de fase reversa C18 (Acquity UPLC® BEH C18 5,0 cm x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters). Os solventes constituintes da fase móvel foram: acetato de amônio 10 mM em água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em modo de eluição por gradiente linear. Para a separação cromatográfica foi aplicado inicialmente 95 % do solvente A e 5 % do solvente B até 1 (um) minuto, seguido pelo gradiente linear de 5 – 95 % do solvente B até 2 (dois) minutos e manutenção a 95 % com o solvente B até 3 (três) minutos. Posteriormente, foi efetuado o reequilíbrio da coluna até 5 (cinco) minutos. A taxa de fluxo da fase móvel foi 0,2 mL/min e o volume de injeção 1,00 µL. A temperatura do forno foi mantida a 30 °C e a temperatura do amostrador a 10 °C. O nitrogênio foi empregado como gás nebulizante (vazão de 150 L/hora) e gás secante (vazão de 1.100 L/hora). A tensão do capilar foi ajustada para 3.000 V, a temperatura da fonte para 550 °C e a vazão do gás de colisão (argônio) para 0,15 mL/min. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o programa MassLynx, versão 4.1. As transições adotadas para as quantificações da ST-024.8 e dos demais analitos e informações adicionais sobre os métodos estão dispostas no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros utilizados para a quantificação dos analitos por LC-MS.

Analito	Fase móvel (A)	Fase móvel (B)	Fluxo (mL/min)	Transição	Ionização	Energia de colisão (eV)	Cone (V)
ST-024.8	Acetato de amônio 10 mM	Acetonitrila	0,2	275 > 140	-	20	25
Propranolol*	Ácido fórmico 0,1% m água	Metanol	0,4	260 > 116	+	18	50
Clorotiazida*	Acetato de amônio: acetonitrila 10:90		0,4	294 > 213,9	-	31	50
Dextrometorfano* (PI)	Ácido fórmico 0,1% m água	Metanol	0,4	272,15 > 215,1	+	30	20

*Para a quantificação dos controles e do padrão interno (PI) foram utilizados métodos analíticos cromatográficos e espectrométricos previamente desenvolvidos e validados pelo CIEnP.

6.2.2 Avaliação da integridade da monocamada celular

6.2.2.1 Avaliação através da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

A integridade da monocamada celular foi avaliada por meio da medida da TEER (Resistência Elétrica Transepitelial), anteriormente e após o ensaio. Previamente à mensuração da TEER, o meio de cultura foi removido, os insertos lavados com HBSS pH 7,4 e efetuada a estabilização do sistema incubando os insertos por, aproximadamente, 15 minutos a $37 \pm 0,5$ °C com HBSS pH 7,4. Em seguida foram efetuadas as medições da TEER usando o voltímetro Millicell® ERS (Millipore). O procedimento de medida seguiu as recomendações do fabricante do equipamento e a TEER foi calculada conforme a Equação 2.

Equação 2. $TEER = (R - R_b) \times A$ (Ω cm²)

R = Resistência mensurada em Ω

R_b = Resistência do branco em Ω

A = Área do filtro em cm²

6.2.2.2 Avaliação através da determinação da permeabilidade do *Lucifer Yellow*

O composto fluorescente de baixa permeabilidade *Lucifer Yellow* foi utilizado como controle da integridade da monocamada celular ao final do ensaio de permeabilidade (Hubatsch *et al.*, 2007). Esse composto foi solubilizado em HBSS pH 7,4 na concentração de 100 μ g/mL e aplicado no compartimento apical (400 μ L) do sistema *Transwell*. No compartimento basolateral foi adicionado HBSS pH 7,4 (1.200 μ L). Os insertos foram incubados protegidos da luz, a aproximadamente 37 °C e sob agitação de, aproximadamente, 100 rpm por 1 hora. O conteúdo do compartimento basolateral teve a fluorescência mensurada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/535 nm. A P_{app} do *Lucifer Yellow* foi calculada a partir da Equação 3.

Equação 3. $P_{app} = (\Delta Q) / (\Delta t) \times 1/A \times C_0$ (cm/s)

(ΔQ) / (Δt) = Variação da concentração inicial no tempo em mol/s

A = Área do filtro em cm²

C₀ = Concentração inicial no compartimento doador em mol/mL

6.2.3 Ensaio de permeabilidade

As células Caco-2 foram cultivadas nos insertos por no mínimo 24 e no máximo a 25 dias. No momento do ensaio, o meio de cultura foi removido e os insertos foram lavados com HBSS pH 7,4 para preparo e realização das medidas da TEER inicial, conforme previamente descrito. Para a avaliação da permeabilidade, 400 µL do Item de Teste diluído em tampão HBSS pH 6,5 foram aplicados no compartimento apical, enquanto que, no compartimento basolateral, foram adicionados 1.200 µL do tampão HBSS pH 7,4. Os insertos foram incubados a $37 \pm 0,5$ °C e $5 \pm 0,2$ % de CO₂ sob agitação de, aproximadamente, 150 rpm. Alíquotas de 600 µL do compartimento basolateral foram coletadas a cada 30 minutos ao longo de um período de 2 horas. O mesmo volume de amostra removido foi substituído por tampão HBSS pré-aquecido (~37 °C) com pH correspondente. As alíquotas obtidas foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e utilizadas para a quantificação por LC-MS. Os valores de P_{app} foram calculados conforme a Equação 3 previamente descrita. Após as coletas foi determinada a TEER final e executada a avaliação da permeabilidade do *Lucifer Yellow*. Foram considerados válidos os insertos que apresentaram TEER inicial e final maior que 200 Ωcm² e permeabilidade do *Lucifer Yellow* menor que 1×10^{-6} cm/s.

6.3 Grupos experimentais

Quadro 2. Representação dos grupos experimentais e concentrações por grupo experimental			
Grupos experimentais	<i>Veículo</i>	<i>Item de Teste</i>	<i>Itens de Referência</i>
Tratamento	HBSS	ST-024.8	Clorotiazida (SR-136) Propranolol (SR-157)
Concentrações	-	50 µM	10 µM
Sistema Teste	Linhagem Caco-2		
Replicatas	3		
Número experimental	2		

6.4 Análise estatística

Foi utilizado o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e o Microsoft® Office Excel para as análises estatísticas. Os valores foram apresentados em números absolutos \pm seu desvio padrão (SD) ou em porcentagem.

7. RESULTADOS

7.1 Validação do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para a quantificação da ST-024.8

Os parâmetros analisados para a validação do método analítico foram: linearidade, precisão e exatidão. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 1, 2 e 3. As curvas de calibração apresentaram um coeficiente de correlação igual a 0,9969, ou seja, a linearidade foi adequada (quanto mais próximo de 1, melhor a linearidade), como mostrado na tabela 1. A precisão para todos os controles de qualidade se mostrou satisfatória, com o coeficiente de variação percentual oscilando de 4,39 a 5,55 %, sendo que o recomendado pelas agências regulatórias é que o CV% seja inferior a 15 % (Tabela 2). A exatidão também se mostrou adequada, variando de 93 a 98 %, aproximadamente, sendo que o recomendado é entre 80 a 120 % (Tabela 3).

Tabela 1. Parâmetros de linearidade do método analítico

Curva	Equação da reta	R2	r
Dia 1	$y = 9238x - 4297$	0,9932	0,9966
Dia 2	$y = 11794x - 8091$	0,9943	0,9971
	Média	0,9938	0,9969
	DP	0,0008	0,0004
	CV	0,08	0,04

Legenda: CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão.

Tabela 2. Parâmetros de precisão do método analítico

CQ	[] nominal μM	HBSS			Água		
		Média	DP	CV	Média	DP	CV
CQB	2,25	20180,33	105,15	0,52	34971,00	1536,36	4,39
CQM	7,50	72459,00	931,09	1,28	120531,33	6688,06	5,55
CQA	12,50	131524,33	7197,20	5,47	213789,67	10163,37	4,75

Legenda: CQ: Controle de qualidade; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de concentração intermediária; CQA: controle de qualidade de alta concentração; HBSS: *Hank's balanced salt solution*; CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão

Tabela 3. Parâmetros de exatidão do método analítico

CQ	[] nominal μM	HBSS			Água		
		Média	[] exp. μM	% bias	Média	[] exp. μM	% bias
CQB	2,25	20180,33	2,65	117,76	34971,00	2,18	96,75
CQM	7,50	72459,00	8,31	110,78	120531,33	7,02	93,59
CQA	12,50	131524,33	14,70	117,62	213789,67	12,30	98,38
		Média		115,38	Média		96,24

Legenda: CQ: Controle de qualidade; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de concentração intermediária; CQA: controle de qualidade de alta concentração; HBSS: *Hank's balanced salt solution*; CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão.

O limite de quantificação foi estabelecido como o menor ponto da curva (0,75 μM) e o limite de detecção determinado pela relação sinal-ruído foi de 3,72 nM. A análise do limite de quantificação pela relação sinal-ruído foi de 11,3 nM.

7.2 Avaliação da integridade da monocamada celular através da TEER e da permeabilidade do *Lucifer Yellow*

Conforme apresentado na Tabela 4, todos os insertos utilizados nos ensaios de permeabilidade, tanto para análise da permeabilidade do Item de Teste 024.8 como da permeabilidade dos controles experimentais, obedeceram aos critérios de aceitação estabelecidos para a metodologia, TEER > 200 Ωcm^2 e P_{app} do *Lucifer Yellow* < 1×10^{-6} cm/s. Os resultados apresentados indicam adequada integridade da monocamada celular e diferenciação celular nos insertos utilizados.

Tabela 4. Valores de TEER (Ωcm^2) e de Permeabilidade aparente (P_{app}) do *Lucifer Yellow* (cm/s) para os insertos utilizados nos ensaios de permeabilidade.

Ensaio	Amostra	TEER inicial calculada (Ωcm^2)*	TEER final calculada (Ωcm^2)*	Permeabilidade do <i>Lucifer Yellow</i> (cm/s)*
1/1	ST-024.8	732,48	693,28	$-1,3 \times 10^{-7}$
1/2	ST-024.8	748,16	723,52	$9,3 \times 10^{-7}$
1/3	ST-024.8	760,48	740,32	$7,6 \times 10^{-7}$
1/4	Propranolol	789,6	772,8	$7,6 \times 10^{-7}$
1/5	Clorotiazida	809,76	794,08	$7,8 \times 10^{-7}$
2/1	ST-024.8	801,9	748,2	$-1,9 \times 10^{-6}$
2/2	ST-024.8	799,7	730,2	$-3,9 \times 10^{-6}$
2/3	ST-024.8	823,2	786,2	$-3,0 \times 10^{-6}$
2/4	Propranolol	835,5	799,7	$-3,3 \times 10^{-6}$
2/5	Clorotiazida	818,7	781,8	$-4,7 \times 10^{-6}$

* Critérios de aceitação: TEER > 200 Ωcm^2 e P_{app} do *Lucifer Yellow* < 1×10^{-6} cm/s.

7.3 Controles experimentais

Foram utilizados como controles experimentais (Itens de Referência) propranolol (SR-157, controle de alta permeabilidade) e clorotiazida (SR-136, controle de baixa permeabilidade) (EMA, 2018). Como mostrado na Tabela 5, o propranolol apresentou P_{app} média de $19,7 \times 10^{-6} \pm 1,98 \times 10^{-6}$ cm/s (Tabela 5), acima de 10×10^{-6} cm/s, o que o caracteriza como um fármaco de alta permeabilidade (Rinaki *et al.*, 2003). Para a clorotiazida, as áreas obtidas por LC-MS foram inferiores ao limite de quantificação do método analítico desenvolvido (< 0,02 μM) e sua análise, a partir do compartimento doador (apical) ao final do ensaio de permeabilidade, demonstrou uma recuperação maior que 85 % (Tabela 6), sendo o esperado para um composto de baixa permeabilidade. Isso significa que a clorotiazida não permeou ou que pequena quantidade desse fármaco permeou a monocamada celular.

De acordo com os dados apresentados, os controles experimentais de alta e baixa permeabilidade utilizados, juntamente com as avaliações de integridade da monocamada, efetuadas pela mensuração da TEER e determinação da P_{app} do *Lucifer Yellow*, validam o

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

sistema teste utilizado para o estudo da permeabilidade do Item de Teste 024.8 (Hubatsch *et al.*, 2007; EMA, 2018).

Tabela 5. Valores de permeabilidade aparente (P_{app}) dos controles experimentais.				
Propranolol – Controle de alta permeabilidade				
Intercepto	Slope	R^2	Pontos da curva	P_{app} (cm/s)
-4,94E-03	1,03E-03	0,9936	5	1,83E-05
-5,56E-03	1,19E-03	0,9938	5	2,11E-05
Média				1,97E-05
DP				1,98E-06
Clorotiazida – Controle de baixa permeabilidade				
Intercepto	Slope	R^2	Pontos da curva	P_{app} (cm/s)
*	*	*	5	<LQ
*	*	*	5	<LQ
Média				*
DP				*

Legenda: * Valores não puderam ser calculados; LQ: Limite de Quantificação; P_{app} : Permeabilidade Aparente; DP: Desvio Padrão.

AValiação DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

Tabela 6. Valores de quantificação e recuperação dos controles experimentais.

Tempo (minutos)	Propranolol			Clorotiazida		
	Quantificação 1	Quantificação 2	Média	Quantificação 1	Quantificação 2	Média
0	7,87	7,98	7,92	11,17	11,11	11,14
30	0,21	0,25	0,23	0,00	0,00	0,00
60	0,42	0,47	0,45	0,01	0,00	0,01
90	0,50	0,57	0,53	0,00	0,01	0,00
120	0,50	0,56	0,53	0,01	0,01	0,01
BM	4,07	3,93	4,00	10,37	9,96	10,17
Rec (%)	48,90	47,50	48,20	83,80	88,80	86,30

* Recuperação (Rec) calculada considerando o balanço de massas (BM). Cálculo conforme a equação $[R = (C_2 \times V_2) \times 100 / (C_1 \times V_1)]$, em que C₁: concentração inicial, V₁: volume inicial, C₂: concentração final e V₂: volume final.

7.4 Determinação da Permeabilidade Aparente (P_{app}) da ST-024.8 utilizando o modelo *Transwell* com células Caco-2

A ST-024.8 não foi detectada no compartimento basolateral do sistema *Transwell* em concentrações acima do limite de detecção estabelecido (LD = 3,72 nM) (Tabela 7). A permeabilidade deste Item de Teste ficou abaixo do limite de detecção, caracterizando-a como uma molécula de baixa permeabilidade ($P_{app} < 2 \times 10^{-6}$ cm/s) (Rinaki *et al.*, 2003). A média da recuperação da ST-024.8 foi de 28 %; sendo assim, a baixa recuperação pode estar associada a fatores isolados ou combinados, como: i) possível metabolização do Item de Teste por enzimas celulares durante o ensaio; ii) degradação da molécula em meio aquoso submetida à temperatura de 37 °C; iii) retenção do Item de Teste nas células e/ou na membrana hidrofílica dos insertos, visto que a ST-024.8 possui caráter hidrofílico e estrutura molecular relativamente polar (Figura 3).

Tabela 7. Quantificação da ST-024.8 nas amostras obtidas no ensaio de permeabilidade com células Caco-2.

Tempo (minutos)	Quantificação da ST-024.8 Repetição 1			Quantificação da ST-024.8 Repetição 2			Média (μM)
0	46,10	41,97	42,02	44,78	50,48	47,14	45,41
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BM	14,36	14,58	13,06	9,26	16,85	17,47	14,26
Rec (%)	27,96	32,93	29,51	17,69	28,88	31,97	28,16

* Recuperação (Rec) calculada considerando o balanço de massas (BM). Cálculo conforme a equação $[R = (C_2 \times V_2) \times 100 / (C_1 \times V_1)]$, em que C_1 : concentração inicial, V_1 : volume inicial, C_2 : concentração final e V_2 : volume final.

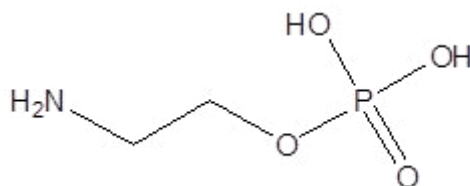


Figura 3. Estrutura molecular da ST-024.8, Massa Molecular = 141,06 g/mol.

8. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados do estudo *in vitro* sugerem que a fosfoetanolamina (ST-024.8), quando avaliada em modelo de permeabilidade com sistema *Transwell* e células Caco-2, possivelmente seja uma molécula com baixa permeabilidade intestinal e baixa absorção em humanos.

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-B03/versão atual: Registro, revisão e arquivamento de dados brutos;
- 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-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

Awortwe, C.; Fasinu, P. S.; Rosenkranz, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. *J Pharm Pharm Sci*, v. 17, n. 1, p. 19, 2014.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil: Ministério da Saúde, 2017.

EMA (European Medicines Agency). ICH guideline M9 on biopharmaceutics classification 4 system based biowaivers. Committee for Human Medicinal Products. 1-17, 2018

Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artusson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, v.2(9):2111-2119, 2007.

Li, AP. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today*, v.6 (7): 357-66, 2001.

Rinaki E, Valsami G, Macheras P. Quantitative biopharmaceutics classification system: The central role of dose/solubility ratio. *Pharm Res*; 20: 1917-25, 2003.

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM CÉLULAS CACO-2.

Wang Z, Hop ECA, Leung KH, Pang JM. Determination of in vitro permeability of drug candidates through a Caco-2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 35:71–76, 2000.


Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, Boutina D, Beck G, Sherbone B, Cooper I, Platts JA.. Evaluation of Human Intestinal Absorption Data and Subsequent Derivation of a Quantitative Structure±Activity Relationship (QSAR) with the Abraham Descriptors. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90:749-784, 2001.

Confidencial

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM
CÉLULAS CACO-2.

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

30/07/19
Data

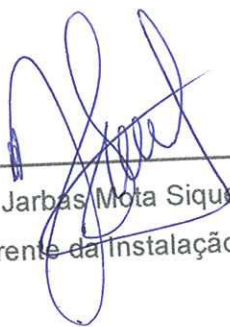
Confidencial

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL *IN VITRO* DA FOSFOETANOLAMINA EM
CÉLULAS CACO-2.

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.

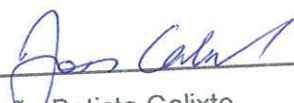
Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.



Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

30/07/2019

Data



Dr. João Batista Calixto
Diretor Presidente

30/07/2019

Data