UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de
fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ*
em ratos**

Thaís Marinho Dezani

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

**São Paulo
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de
fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ*
em ratos**

Thaís Marinho Dezani

Versão original

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

**São Paulo
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por meio impresso ou eletrônico, para fins de estudo e/ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Dezani, Thaisa Marinho
D532a   Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de
             fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ*
             em ratos / Thaisa Marinho Dezani. -- São Paulo, 2017.
             420p.

             Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
             Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
             Orientador : Serra, Cristina Helena dos Reis

             1. Biofarmácia 2. Biofarmacotécnica I. T. II. Serra, Cristina
             Helena dos Reis, orientador.

615.4b

CDD

Thaia Marinho Dezani

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de
fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ*
em ratos**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. 1º Examinador

Prof. Dr. 2º Examinador

Prof. Dr. 3º Examinador

Prof. Dr. 4º Examinador

São Paulo, __ de _____ de 2017.

*“You can dream, create, design and build
the most wonderful place in the world,
but it requires people
to make the dream a reality.”*

*Walter Elias “Walt” Disney
1901-1966*

Dedico este trabalho ao meu querido marido André,

Aos meus queridos pais Charles e Etienne,

E aos meus amados irmãos Júnior, Isis e Blenda.

*Confia ao Senhor as tuas obras,
e teus pensamentos serão estabelecidos*

Provérbios 16:3

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ser meu apoio em diversos momentos.

Ao meu querido marido André, que por inúmeras vezes foi compreensivo e companheiro, me auxiliando e me incentivando incansavelmente durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo seu grande apoio, meu querido!

Aos meus amados pais Charles e Etiene e meus irmãos Blenda, Isis e Júnior, pela compreensão, incentivo e paciência. Amo vocês!

Aos meus sogros Sueli e Edison e à minha cunhada Carla pela imensurável paciência, compreensão e apoio.

Minhas tias Geni e Riso pelo apoio. Agradeço especialmente minha tia Dulce, que sempre foi minha inspiração desde a infância, alimentando minha paixão pela área da saúde.

Ao meu primo Hugo, que sempre me deu apoio e me auxiliou em diversos momentos.

À querida Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, pela confiança em mim depositada desde o mestrado. Obrigada pela paciência, apoio, incentivo e inspiração durante as diversas etapas deste trabalho.

Às minhas amigas Paula Lenária, Paula Mendonça e Joyce pelos momentos de alegria, compreensão e incentivo.

Aos colegas Mônica, Ruberlan, Marina, Michelle, João, Juliana Reis, Juliana Maura, José Eduardo, Michele Issa, Marcelo Duque e Eremita pelo companheirismo e troca de experiências.

À Claudineia e ao Edgar pela amizade e por terem sido sempre colaborativos.

Aos membros da Comissão de Ética no Uso de Animais, em especial ao Jorge e ao Prof. Joilson pelo grande aprendizado enquanto representante discente.

Aos secretários Miram, Irineu, David, Alexandre, Kelma e Luiz pelo apoio de sempre.

Aos funcionários da biblioteca do Conjunto das Químicas pela elaboração da ficha catalográfica e pela atenção dispensada.

Aos funcionários do biotério do Conjunto das Químicas pela atenção e por mostrarem-se sempre prestativos.

Agradeço em especial ao Prof. Leslie Z. Benet da Universidade da Califórnia San Francisco (UCSF) pela oportunidade de desenvolver parte dos meus experimentos em seu laboratório. Obrigada pelas valiosas contribuições, paciência e pela inspiração.

Aos colegas do *Benet Lab* e do *Drug Studies Unit* da UCSF: Chelsea, Rosa, Mark, Christine, Jasleen, Jin Dong, Saki, Caroline, Hideaki, Xin Huang, Alan, Aaron, Nadya, Hsin-Fang, Howard e Sue Adair. Agradeço em especial à Frances, pelos inúmeros momentos de alegria, aprendizado e troca de experiências.

Aos amigos de San Francisco Ricardo, Magda, Dioneia, Francisco, Léo, Susan, Oscar, Sandra e família pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do *English Corner*, em especial à Deborah e à Shirley.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma significativa para este trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XVII
APRESENTAÇÃO.....	21
RESUMO	27
ABSTRACT	30
OBJETIVO	33
OBJETIVO GERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
CAPÍTULO 1: CONCEITOS GERAIS EM BIOFARMACOTÉCNICA	36
1.1 A IMPORTÂNCIA DO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB) E DO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS (SCBDF) PARA O DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO E PARA OS PROCESSOS DE BIOISENÇÃO.....	37
RESUMO	38
INTRODUÇÃO	40
SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB).....	42
SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS (SCBDF).....	46
COMPARAÇÃO ENTRE SCB E SCBDF	50
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	55
1.2 MODELO DE PERFUSÃO IN SITU EMPREGADO NOS ESTUDOS DE PERMEABILIDADE, TRANSPORTE E METABOLISMO INTESTINAL DE FÁRMACOS.....	60
RESUMO	61
INTRODUÇÃO	63
ESTUDOS DE PERMEABILIDADE	65
PERFUSÃO IN SITU DE PASSAGEM SIMPLES (SINGLE-PASS INTESTINAL PERFUSION, SPIP).....	69

Condições gerais empregadas nos ensaios de perfusão <i>in situ</i>	71
Cálculos dos parâmetros relacionados ao modelo de perfusão <i>in situ</i>	75
VIA ORAL DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS	79
ESTUDO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> E SUA APLICAÇÃO NO SCB E NO SCBDF	86
CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS.....	90
1.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MECANISMO DE EFLUXO PELA P-GP NOS ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL	98
RESUMO	99
INTRODUÇÃO	101
GLICOPROTEÍNA-P (P-GP).....	105
INIBIDORES DE P-GP	109
MÉTODOS PARA A AVALIAR A INFLUÊNCIA DE P-GP NA PERMEABILIDADE	110
MÉTODOS <i>IN VITRO</i>	111
MDCK e MDCK-MDR1	112
Caco-2	113
MÉTODOS <i>EX-VIVO</i>	114
MÉTODOS DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i>	115
CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS.....	118
1.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO PELA CYP3A NOS ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL	128
RESUMO	129
INTRODUÇÃO	131
ENZIMAS PRESENTES NO TRATO GASTRINTESTINAL (TGI).....	133
MÉTODOS EMPREGADOS NOS ESTUDOS DE METABOLISMO INTESTINAL	135
MODELOS <i>IN VITRO</i>	135
Células Caco-2 e MDCK.....	135
Microsomas	137
MÉTODOS <i>EX VIVO</i>	138
Homogenato intestinal	138
Sacos invertidos	139
Segmentos intestinais em câmaras de difusão	140
MÉTODO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i>	140

CONCLUSÃO	142
REFERÊNCIAS.....	144
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> EM RATOS E <i>IN VITRO</i> EM CULTURAS CELULARES MDCK	150
RESUMO	151
INTRODUÇÃO	154
MATERIAIS E MÉTODOS	161
MATERIAIS	162
AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL POR MEIO DO MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> COM COLETA DE SANGUE MESENTÉRICO	163
OBTENÇÃO DE SANGUE A PARTIR DE RATOS DOADORES	163
PREPARO DA SOLUÇÃO DE PERFUSÃO	163
ENSAIO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> COM COLETA DE SANGUE MESENTÉRICO.....	165
Cálculos relacionados aos ensaios de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico	167
AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL POR MEIO DO MODELO <i>IN VITRO</i> EM MDCK	169
Cálculo da permeabilidade aparente (P_{ap}) e porcentagem de recuperação.....	172
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	172
RESULTADOS E DISCUSSÕES	174
AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL POR MEIO DO MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> COM COLETA DE SANGUE MESENTÉRICO	175
DETERMINAÇÃO DA P_{EF} E DA P_{AP} DOS MARCADORES METO E RNT	176
DETERMINAÇÃO DA P_{EF} E DA P_{AP} DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS E PREDIÇÃO DA ABSORÇÃO ORAL EM SERES HUMANOS	180
ESTUDO DE PERMEABILIDADE POR MEIO DO MODELO <i>IN VITRO</i> EM MDCK	190
MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> VERSUS MÉTODO <i>IN VITRO</i> EM MDCK	194
CONCLUSÃO	197
REFERÊNCIAS.....	199

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE EFLUXO DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS MODELOS DE PERFUSÃO *IN SITU* E *IN VITRO* EM MDCK-MDR1 209

RESUMO	210
INTRODUÇÃO	212
MATERIAIS E MÉTODOS	217
MATERIAIS	218
AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE EFLUXO EM MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> COM	
COLETA DE SANGUE MESENTÉRICO	218
Preparo da solução de perfusão	219
Ensaio de perfusão <i>in situ</i>	220
Cálculos relacionados aos ensaios de perfusão <i>in situ</i> com coleta de	
sangue mesentérico	222
AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE EFLUXO EM MODELO <i>IN VITRO</i> MDCK-MDR1	223
Preparo das culturas celulares MDCK-MDR1	224
Verificação da viabilidade celular	224
Estudo bidirecional de transporte em MDCK-MDR1	225
Cálculos relacionados aos ensaios <i>in vitro</i> MDCK-MDR1	226
RESULTADOS E DISCUSSÕES	227
AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE EFLUXO EM MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> COM	
COLETA DE SANGUE MESENTÉRICO	228
Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos marcadores METO e RNT	229
Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos fármacos antirretrovirais d4T,	
3TC e AZT	233
AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE EFLUXO EM MODELO <i>IN VITRO</i> MDCK-MDR1	241
Verificação da viabilidade celular	241
Estudo bidirecional de transporte em MDCK-MDR1	243
MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> VERSUS MODELO <i>IN VITRO</i> MDCK-MDR1	249
CONCLUSÃO	251
REFERÊNCIAS	253

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO INTESTINAL NA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DO MODELO DE PERFUSÃO *IN SITU* 260

RESUMO	261
INTRODUÇÃO	263
MATERIAIS E MÉTODOS	267
MATERIAIS	268
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO INTESTINAL PELA CYP3A NA PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS	268
Preparo da solução de perfusão	269
Ensaio de perfusão <i>in situ</i>	269
Cálculos relacionados aos ensaios de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico	271
Análise estatística dos resultados.....	273
RESULTADOS E DISCUSSÕES	274
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO INTESTINAL PELA CYP3A NA PERMEABILIDADE DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS	275
Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos marcadores METO e RNT	276
Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT	280
CONCLUSÃO	288
REFERÊNCIAS.....	290
CAPÍTULO 5: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS	297
5.1 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico empregado na quantificação das amostras de perfusato obtidas por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i>	298
RESUMO	299
INTRODUÇÃO	301
MATERIAIS E MÉTODOS	304
MATERIAIS	305
INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	305
MÉTODOS	306
Estudo de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> em ratos	306
Soluções padrão estoque (SPE)	308

Soluções padrão de trabalho (SPT).....	308
Validação do método cromatográfico em CLAE	308
RESULTADOS E DISCUSSÕES	310
Aplicação do método cromatográfico na quantificação das amostras de perfusato.....	315
CONCLUSÃO	318
REFERÊNCIAS.....	320
5.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico empregado na quantificação das amostras de plasma sanguíneo obtidas por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i>	324
RESUMO	325
INTRODUÇÃO	327
MATERIAIS E MÉTODOS	330
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	331
MÉTODOS	331
ESTUDO DE PERMABILIDADE INTESTINAL POR MEIO DO MODELO DE PERFUSÃO <i>IN SITU</i> COM COLETA DE SANGUE MESENTÉRICO	331
Preparo das amostras de plasma provenientes dos estudos de perfusão <i>in situ</i>	333
VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO EM CLAE	333
RESULTADOS E DISCUSSÕES	338
VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO FR-CLAE	339
APLICAÇÃO DO MÉTODO FR-CLAE VALIDADO NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	343
CONCLUSÃO	345
REFERÊNCIAS.....	347
5.3 Desenvolvimento e validação do método LC-MS/MS empregado na quantificação das amostras provenientes dos estudos <i>in vitro</i> MDCK e MDCK-MDR1	351
RESUMO	352
INTRODUÇÃO	354
MATERIAIS E MÉTODOS	357
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	358
MÉTODOS	358

ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEABILIDADE E TRANSPORTE DE EFLUXO EM MDCK E MDCK-MDR1	358
Validação do método LC-MS/MS.....	359
RESULTADOS E DISCUSSÕES	362
APLICAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS VALIDADO NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i> MDCK E MDCK-MDR1	367
CONCLUSÕES	369
REFERÊNCIAS.....	371
CONSIDERAÇÕES FINAIS	375
ANEXOS	381
ANEXO A	382
INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA JULGADORA DE	382
DOUTORADO.....	382
ANEXO B	384
APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE ESTUDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	384
ANEXO C	386
FICHA DO ALUNO.....	386
ANEXO D	389
CURRÍCULO LATTES	389
ANEXO E	398
ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE.....	398
DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; SILVA, M.M.C.; SERRA, C.H.R. In situ intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 17, p.746-757, 2017.....	399
DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; JUNIOR, J.B.S.; SERRA, C.H.R. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.104, p.131-139, 2016.....	400
RA, C.H.R.; CHANG, K.H.; DEZANI, T.M.; PORTA, V.; STORPIRTIS, S. Dissolution efficiency and bioequivalence study using urine data from healthy volunteers: a comparison between two tablet formulations of	

cephalexin. <i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences</i> , v.51, n.2, p.383-392, 2015.....	401
JUNIOR, J.B.S.; DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; SERRA, C.H. Evaluating potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permeability model for assessing gastrointestinal drug absorption. <i>Mini-Reviews in Medicinal Chemistry</i> , v.15, p.858-871, 2015.	402
DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; CAFFARO, A.M.; REIS, J.M.; SERRA, C.H.R. Equilibrium solubility <i>versus</i> intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. <i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences</i> , v.49, n.4, 2013.	403
DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; CAFFARO, A.M.; REIS, J.M.; SERRA, C.H.R. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different <i>ex vivo</i> method in Franz cells. <i>Journal of Pharmacological and Toxicological Methods</i> , v.67, p.194-202, 2013.	404
REIS, J.M.; DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; AVDEEF, A.; SERRA, C.H.R. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, <i>ex vivo</i> and <i>in situ</i> Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> , v.48, p.781-789, 2013.....	405
ANEXO F.....	406
ARTIGOS EM ELABORAÇÃO RELACIONADOS E/OU PERTENCENTES À TESE.....	406
Biopharmaceutics Classification System (BCS) and Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Applications in drug development and biowaiver processes.....	407
In vitro, ex vivo and in situ methods applied in the evaluation of intestinal drug permeability	408
Main aspects related to the intestinal metabolism and its influence in drug absorption.....	409
Evaluation of the drug-efflux interaction of antiretroviral drugs through in vitro MDCK-MDR1, ex vivo and in situ models	410
Evaluation of the CYP3A influence in the intestinal permeability of antiretroviral drugs by in vitro microsomes and ex vivo and in situ models	411

Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of lamivudine, stavudine and zidovudine in samples from the Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) studies	412
Development and validation of the LC-MS/MS chromatographic method for the quantification of antiretroviral drugs in metabolism, efflux and in situ studies.....	413
Development and validation of the chromatographic method for the simultaneous quantification of stavudine, lamivudine and zidovudine in <i>ex vivo</i> permeability studies	414
Development and validation of the LC-MS/MS chromatographic method for the quantification of antiretroviral drugs in metabolism and efflux studies	415
ANEXO G	416
PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS.....	416
“4 th International Pharma & Clinical pharmacy Congress – Poster Presentation”	417
“4 th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress – Oral Presentation”	418
“2015 AAPS Annual Meeting and Exposition – Poster Presentation” ..	419
“6 th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence BA/BE Studies Summit – Poster Presentation”	420

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Classificação biofarmacêutica dos fármacos de acordo com o SCB.	43
Quadro 1.2: Classificação biofarmacêutica dos fármacos de acordo com o SCBDF.	47
Quadro 1.3: Influência de transportadores presentes em diferentes tecidos biológicos de acordo com a classe biofarmacêutica do SCBDF.	48
Quadro 1.4: Principais variáveis e condições experimentais relacionadas aos estudos de perfusão <i>in situ</i> reportados na literatura.	72
Quadro 1.5: Valores de pH em diferentes porções do TGI sob condição de jejum e no estado alimentado (ASHFORD, 2002; AVDEEF, 2003).	80
Quadro 1.6: Principais carreadores de influxo e de efluxo considerados nos estudos de transporte de fármacos, suas localizações no enterócito, principais substratos e animais geneticamente modificados (<i>knockout</i>).	84
Quadro 1.7: Localização e função da P-gp em função do tecido biológico presente no organismo (adaptado de (JUNIOR et al., 2015)).	107
Quadro 1.8: Principais modelos empregados nos estudos de efluxo, suas vantagens e limitações (adaptado de (JUNIOR et al., 2015)).	111
Quadro 1.9: Tipos de enzimas CYP expressas pelas células Caco-2, seus substratos e metabólitos (adaptado de (KÜBLBECK et al., 2016)).	136
Quadro 2.1: Comparação das principais características dos ensaios realizados em modelo <i>in vitro</i> MDCK e em modelo de perfusão intestinal <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico.	159
Quadro 2.2: Concentração dos fármacos e das substâncias marcadoras na solução de perfusão utilizada nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico.	164
Quadro 5.1: Condições cromatográficas definidas para a quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT em CLAE.	335
Quadro 5.2: Condições adotadas para os processos de validação cromatográfica por LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) contidos em amostras provenientes dos estudos <i>in vitro</i> em MDCK e MDCK-MDR1.	360

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Tipos de perfusão <i>in situ</i> : (A) oscilação de perfusato; (B) recirculação de perfusato; (C) perfusão de passagem simples; (D) método de circuito fechado e (E) perfusão de passagem tripla (adaptado de DAHAN, WEST, AMIDON, 2009; SCHURGERS et al., 1986).....	69
Figura 1.2: Esquema representativo do ensaio de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico. A reposição do volume sanguíneo é realizada através da veia jugular (Adaptado de (CUMMINS et al., 2003).	71
Figura 1.3: Representação esquemática da monocamada de enterócitos, lados apical e basolateral, junções intercelulares, microvilosidades e principais mecanismos de transporte envolvidos nos processos de absorção de fármacos: (A) transporte passivo paracelular; (B) transporte passivo transcelular; (C) transporte ativo mediado por transportador de efluxo; (D) transporte ativo transcelular mediado por transportador de influxo e (E) transporte por endocitose (adaptado de (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000)).....	81
Figura 1.4: Representação esquemática da monocamada de enterócitos e as principais vias de transporte de fármacos: (1) transporte ativo mediado por carreador de efluxo; (2) transporte passivo paracelular; (3) transporte passivo transcelular; (4) transporte ativo mediado por carreador de influxo e (5) endocitose (adaptado de (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; JUNIOR et al., 2015)).	103
Figura 1.5: Representação esquemática da estrutura da P-gp presente nos enterócitos. Esta glicoproteína é formada por duas porções proteicas e a primeira volta extracelular é fortemente N-glicosilada (adaptado de (JUNIOR et al., 2015)).	106
Figura 2.1: Representação esquemática do desenho experimental empregado nos estudos de permeabilidade em modelo <i>in vitro</i> MDCK.....	171
Figura 2.2: Perfis de P_{ef} obtidos para os fármacos e marcadores empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico (n=6).....	181
Figura 2.3: Perfis de P_{ap} obtidos para os fármacos e marcadores empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico (n=6).....	181

- Figura 2.4:** Representação gráfica comparativa entre os valores de P_{ef} obtidos em ratos por meio do modelo de perfusão *in situ* e os valores de P_{ef} e F_a preditos para seres humanos.....187
- Figura 2.5:** Representação gráfica dos resultados de P_{ap} obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK para os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT ($n=3$) na direção $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$. A análise estatística foi realizada entre as condições $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ ($p < 0,05$ em comparação com a condição $A \rightarrow B$ para cada substância).....191
- Figura 2.6:** Representação gráfica e comparação estatística dos resultados de P_{ap} obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK para os fármacos d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT nas direções $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ (* resultados $p < 0,05$ em comparação com o METO; ** resultados $p < 0,05$ em comparação com a RNT). 192
- Figura 3.1:** Representação esquemática da monocamada de enterócitos mostrando os lados apical e basolateral, as junções intercelulares, microvilosidades e as principais vias envolvidas nos mecanismos de transporte de fármacos: (A) transporte passivo paracelular; (B) transporte passivo transcelular; (C) transporte ativo mediado por carreador de efluxo; (D) transporte ativo mediado por carreador de influxo e (E) endocitose (Adaptado de Dezani et al., 2017 - *ahead of print*)...214
- Figura 3.2:** Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT na ausência e na presença de VRP obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado ($n=6$). 231
- Figura 3.3:** Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores na ausência e na presença de VRP obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado ($n=6$). 235
- Figura 3.4:** Representação gráfica dos resultados de P_{ap} referentes ao estudo bidirecional dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores realizado por meio do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 na ausência e na presença de inibidor de P-gp GG918 ($n=3$). 245
- Figura 4.1:** Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT na ausência e na presença do inibidor de CYP3A (KCZ) obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado ($n=6$). 278

- Figura 4.2:** Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores na ausência e na presença de KCZ obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado (n=6). 282
- Figura 5.1:** Cromatogramas obtidos por CLAE correspondentes ao perfusato branco (A), perfusato com os fármacos antirretrovirais e o PI (B), perfusato com verapamil (C) e perfusato com cetoconazol (D). A detecção foi obtida em UV com comprimento de onda de 270nm. 312
- Figura 5.2:** Cromatogramas obtidos por CLAE correspondentes ao plasma branco (A), plasma com os fármacos antirretrovirais (20 µg/mL) e o padrão interno (B), plasma com verapamil (C) e plasma com cetoconazol (D). A detecção foi obtida em UV com comprimento de onda de 270nm. 340
- Figura 5.3:** Cromatogramas obtidos pelo método LC-MS/MS validado para a quantificação dos fármacos d4t, 3TC e AZT e para o padrão interno CBZ. 364

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Resultados referentes às TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos para cada fármaco ou marcador empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico (n=6).	175
Tabela 2.2: Resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT (n=6) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> e valores de permeabilidade descritos na literatura para os referidos marcadores.	177
Tabela 2.3: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico para os fármacos d4T, 3TC e AZT, bem como para os marcadores METO e RNT (n=6).	180
Tabela 2.4: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} obtidos para cada substância empregada no presente estudo e valores adquiridos da literatura por meio de diferentes modelos.	183
Tabela 2.5: Valores preditos de P_{ef} e de F_a para seres humanos calculados a partir dos resultados obtidos de P_{ef} por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> em ratos e valores de F_a reportados na literatura.	186
Tabela 2.6: Resultados de P_{ap} e seus respectivos valores de desvios padrão (DP) para os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT (n=3) obtidos na direção A→B e B→A.	190
Tabela 3.1: Resultados referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos para cada fármaco ou marcador empregados nos estudos de transporte de efluxo por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico na ausência (-) e na presença (+) de VRP (n=6).	228
Tabela 3.2: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos marcadores (METO e RNT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de transporte por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> na ausência (-) e na presença (+) de VRP. Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).	230
Tabela 3.3: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de transporte por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> na ausência (-) e na presença (+) de inibidor de P-gp VRP. Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).	234

Tabela 3.4: Avaliação estatística dos resultados de P_{ef} na ausência e na presença de VRP, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$	236
Tabela 3.5: Avaliação estatística dos resultados de P_{ap} na ausência e na presença de VRP, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$	237
Tabela 3.6: Razões entre os resultados de P_{ef} e entre os resultados de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores empregados nos estudos de perfusão <i>in situ</i> na presença e na ausência de VRP.....	238
Tabela 3.7: Valores médios da resistência elétrica transepitelial (TEER) obtidos para as monocamadas MDCK-MDR1 empregadas nos estudos de transporte bidirecional na ausência e na presença de GG918 (n=3).	242
Tabela 3.8: Resultados de P_{ap} e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de transporte bidirecional em MDCK-MDR1 dos fármacos d4T, 3TC e AZT e dos marcadores METO e RNT na ausência e na presença de inibidor de P-gp GG918 (n=3).....	244
Tabela 3.9: Valores referentes às razões $P_{ap} B \rightarrow A / P_{ap} A \rightarrow B$ dos resultados de permeabilidade obtidos por meio dos experimentos de transporte bidirecional dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores em células MDCK-MDR1 na ausência e na presença de GG918.	246
Tabela 4.1: Resultados referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos para cada fármaco ou marcador empregados nos estudos de metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico na ausência (-) e na presença (+) de KCZ (n=6).	275
Tabela 4.2: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos marcadores (METO e RNT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> na ausência (-) e na presença (+) do KCZ. Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).	277
Tabela 4.3: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão <i>in situ</i> na ausência (-) e na presença (+) de inibidor de CYP3A Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).....	281
Tabela 4.4: Avaliação estatística dos resultados de P_{ef} na ausência e na presença de KCZ, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$	283

Tabela 4.5: Avaliação estatística dos resultados de P_{ap} na ausência e na presença de KCZ, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$.	284
Tabela 5.1: Resultados referentes aos parâmetros cromatográficos considerados na validação do método analítico em CLAE com detecção em UV para os fármacos 3TC, d4T e AZT.	313
Tabela 5.2: Resultados ($n=6$) de P_{ef} para 3TC, d4T e AZT e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos para cada condição experimental realizada no modelo de perfusão <i>in situ</i> (permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal).	315
Tabela 5.3: Resultados referentes aos parâmetros LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2) obtidos em plasma na validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais. Os valores expressam a média de seis determinações.	339
Tabela 5.4: Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método cromatográfico em CLAE para a quantificação de d4T, 3TC e AZT.	341
Tabela 5.5: Resultados referentes à exatidão do método cromatográfico obtidos a partir da avaliação da estabilidade das amostras de d4T, 3TC e AZT.	342
Tabela 5.6: Resultados ($n=6$) de P_{ap} para 3TC, d4T e AZT e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos para cada condição experimental realizada no modelo de perfusão <i>in situ</i> (permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal).	343
Tabela 5.7: Valores obtidos para os LD, LQ e para os coeficientes de correlação (r^2) para cada fármaco antirretroviral. Os valores expressam a média de seis réplicas.	365
Tabela 5.8: Valores de precisão e exatidão obtidos para o método LC-MS/MS validado para a quantificação da d4T, 3TC e AZT contidos em amostras provenientes dos estudos <i>in vitro</i> em MDCK e MDCK-MDR1.	366
Tabela 5.9: Resultados ($n=3$) de P_{ap} referentes aos estudos bidirecionais dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) conduzidos em MDCK e MDCK-MDR1 (na ausência e na presença de GG918).	368

APRESENTAÇÃO

Desde o surgimento do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e do Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF), muitos estudos sobre a caracterização da solubilidade, da permeabilidade e do metabolismo de fármacos têm sido desenvolvidos para responder às questões relacionadas aos problemas de biodisponibilidade observados *in vivo*.

As metodologias empregadas para os estudos biofarmacêuticos contribuem para compreender o comportamento *in vivo* de uma substância, além de auxiliar em etapas do desenvolvimento farmacêutico. Esses fatores estimularam o desenvolvimento desta tese de doutorado, a qual foi dedicada aos fármacos antirretrovirais. Estas substâncias são de grande importância no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), uma enfermidade de relevante impacto mundial. Além disso, os antirretrovirais estão diretamente relacionados às políticas de saúde existentes no Brasil.

A presente tese de doutorado foi elaborada na forma de capítulos, os quais foram organizados para simplificar a leitura e a compreensão dos assuntos relacionados ao tema principal. Além disso, cada seção foi preparada em formato de manuscrito visando a publicação futura para a divulgação dos dados experimentais obtidos. Desta forma, os principais itens usualmente solicitados pelas revistas científicas foram considerados na composição do presente trabalho.

A organização da tese em capítulos exige a apresentação dos principais conceitos relacionados à área de pesquisa envolvida no trabalho. Assim, antes da abordagem dos capítulos relacionados aos estudos de permeabilidade, efluxo e metabolismo, uma seção dedicada aos conceitos gerais em biofarmacotécnica foi elaborada com o objetivo de familiarizar o leitor com o tema central em relação aos aspectos abordados nos capítulos seguintes.

Desta forma, os capítulos foram estruturados da seguinte maneira:

- *Capítulo 1: Conceitos gerais em biofarmacotécnica;*
- *Capítulo 2: Avaliação da permeabilidade dos fármacos antirretrovirais por meio dos modelos de perfusão in situ em ratos e in vitro em culturas celulares MDCK;*
- *Capítulo 3: Avaliação do transporte de efluxo dos fármacos antirretrovirais por meio dos modelos de perfusão in situ em ratos e in vitro em culturas celulares MDCK-MDR1;*

- *Capítulo 4: Avaliação da influência do metabolismo intestinal na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ em ratos;*
- *Capítulo 5: Desenvolvimento e validação dos métodos bioanalíticos;*
- *Considerações finais.*

O Capítulo 1 apresenta os conceitos e os levantamentos bibliográficos dos assuntos relacionados ao desenvolvimento do presente trabalho. Para isso, foram apresentadas as principais metodologias descritas na literatura para os estudos de permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal com o objetivo de prever a absorção oral *in vivo*. Além disso, duas importantes ferramentas são apresentadas neste capítulo: Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF). Estes dois sistemas auxiliam na predição da biodisponibilidade oral fundamentado em fatores que influenciam os processos de absorção: solubilidade, permeabilidade e metabolismo. Assim, o Capítulo 1 foi dividido em quatro subitens:

- *Item 1.1: A importância do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e do Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) para o desenvolvimento farmacêutico e para os processos de bioensinção;*
- *Item 1.2: Modelo de perfusão in situ empregado nos estudos de permeabilidade, transporte e metabolismo intestinal de fármacos;*
- *Item 1.3: Avaliação da influência do mecanismo de efluxo pela P-gp nos ensaios de permeabilidade intestinal;*
- *Item 1.4: Avaliação da influência do metabolismo pela CYP3A nos ensaios de permeabilidade intestinal;*

É importante ressaltar que os subitens 1.2 e 1.3 do Capítulo 1 encontram-se publicados pela *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* (fator de impacto=2,84). O subitem 1.2 foi publicado com o título “*In situ intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs*” de autoria de Thaisa Marinho Dezani, André Bersani Dezani, Mônica Maria Coquemala da Silva e Cristina Helena dos Reis Serra. Já o subitem 1.3 foi publicado com o título “*Evaluating Potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permeability model for assessing gastrointestinal drug absorption*” de autoria de

João Batista da Silva Júnior, Thaisa Marinho Dezani, André Bersani Dezani e Cristina Helena dos Reis Serra. Os resumos referentes a estas publicações são apresentados em anexo ao final da tese. Os demais subitens do Capítulo 1 estão em fase de elaboração/tradução e contam com as contribuições do Prof. Dr. Leslie Z. Benet (*University of California San Francisco*, EUA).

O Capítulo 2 descreve os experimentos de permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina) realizados por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico e modelo *in vitro* MDCK. Parâmetros de permeabilidade efetiva (P_{ef}), permeabilidade aparente (P_{ap}), permeabilidade efetiva predita para seres humanos ($P_{ef, humanos}$) e fração absorvida predita para seres humanos (F_a) são apresentados e discutidos ao longo deste capítulo. A obtenção dos resultados permitiu realizar a comparação entre os dois modelos com o propósito de auxiliar na elucidação dos mecanismos de transporte envolvidos na permeabilidade dos fármacos estudados. O Capítulo 2 encontra-se atualmente em fase de elaboração/tradução para publicação em periódico de relevante impacto científico.

O Capítulo 3 trata da avaliação da influência do mecanismo de efluxo sobre a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina). A P-gp (glicoproteína-P) é responsável pelo transporte secretório de substâncias do lado apical para o lado basolateral dos enterócitos e constitui o carreador mais estudado, embora seu envolvimento nos processos de absorção oral não seja claro. Os estudos descritos neste capítulo foram realizados por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência e na presença de inibidor de P-gp (verapamil) e por meio do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 também na ausência e na presença de inibidor deste carreador de efluxo (GG918, elacridar).

O Capítulo 4 apresenta o estudo da influência do metabolismo pré-sistêmico intestinal sobre a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina) por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência e na presença de inibidor de enzimas CYP3A (cetoconazol). Este capítulo encontra-se atualmente em fase de elaboração/tradução para publicação em periódico de relevante impacto científico.

Já o Capítulo 5 descreve o desenvolvimento e validação dos métodos bioanalíticos empregados ao longo do presente trabalho (Capítulos 2, 3 e 4). Uma

vez que a quantificação de amostras foi realizada em três diferentes matrizes (perfusato, plasma e solução de transporte), este capítulo foi dividido em três subitens:

-Item 5.1: *Desenvolvimento e validação do método cromatográfico empregado na quantificação das amostras de perfusato obtidas por meio do modelo de perfusão in situ;*

-Item 5.2: *Desenvolvimento e validação do método cromatográfico empregado na quantificação das amostras de plasma sanguíneo obtidas por meio do modelo de perfusão in situ;*

-Item 5.3: *Desenvolvimento e validação do método LC-MS/MS empregado na quantificação de amostras provenientes dos estudos in vitro MDCK e MDCK-MDR1.*

Por fim, na seção final são apresentadas as considerações finais relacionadas a todas as etapas do presente trabalho de tese. Além disso, o ponto de vista da autora é explicitado, bem como as perspectivas em relação aos estudos de predição da absorção *in vivo* na área de biofarmacotécnica.

É importante salientar que os experimentos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico e o desenvolvimento e validação dos métodos bioanalíticos para a quantificação dos fármacos em perfusato e plasma (Capítulos 2, 3, 4 e 5) foram realizados no Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LPB/FCF/USP). Já os experimentos em MDCK, MDCK-MDR1 e o desenvolvimento e validação do método em LC-MS/MS (Capítulos 2 e 3 e 5) foram realizados na *University of California San Francisco* (UCSF) sob a supervisão do Prof. Leslie Z. Benet.

Desta forma, o desenvolvimento do presente trabalho representa uma pequena porção dos estudos de caracterização e predição da absorção *in vivo* de fármacos oralmente administrados, especialmente após a consolidação dos sistemas SCB e SCBDF.

Os processos de bioisenção são amplamente discutidos na atualidade. Entretanto, ainda existe a necessidade de realizar pesquisas que possibilitem prever o comportamento do fármaco *in vivo* de acordo com os sistemas biofarmacêuticos. Assim, o desenvolvimento de ensaios mais robustos e precisos

permitem prever a absorção em seres humanos com maior exatidão, o que evita divergências de resultados constantemente observados na literatura.

Muitos métodos empregados nos estudos biofarmacêuticos estão disponíveis atualmente e o uso de tais metodologias auxilia na elucidação dos mecanismos de transporte e metabolismo intestinal. Tanto o efluxo quanto a metabolização podem estar relacionados à biodisponibilidade incompleta de alguns fármacos oralmente administrados. O emprego racional de experimentos permite, assim, gerenciar os recursos adequadamente de modo a permitir a obtenção dos resultados com maior valor preditivo sem grandes impactos nas questões éticas, burocráticas e financeiras. Com base nisso, tais estudos possibilitam traçar estratégias nas fases iniciais de desenvolvimento farmacêutico para assegurar a eficácia e a segurança dos medicamentos.

RESUMO

DEZANI, T.M. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos.** São Paulo, 2017. 420p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Para medicamentos administrados oralmente, as etapas de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e sua subsequente absorção constituem importantes processos para que a adequada biodisponibilidade oral ocorra. Deste modo, as características de solubilidade e de permeabilidade são de extrema importância para que mecanismos relacionados à absorção sejam compreendidos no âmbito das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Com base nisso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que permite a classificação de fármacos em quatro classes distintas de acordo com a solubilidade e permeabilidade. De maneira complementar, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto levando em consideração a solubilidade e o metabolismo das substâncias, além de considerar o impacto de transportadores presentes nos tecidos biológicos, inclusive no trato gastrointestinal (TGI). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais (estavudina, lamivudina e zidovudina) por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico em ratos, considerando os aspectos relacionados ao efluxo e ao metabolismo pré-sistêmico que ocorrem nos enterócitos. Além disso, estudos *in vitro* em culturas celulares MDCK e MDCK-MDR1 foram realizados a fim de auxiliar na elucidação dos mecanismos de transporte dos referidos fármacos. Para a realização dos estudos de perfusão *in situ*, ratos Wistar foram anestesiados e a porção do jejuno foi canulada para permitir a entrada do fármaco solubilizado no interior do intestino, bem como a coleta das amostras de perfusato em intervalos regulares de tempo. A veia mesentérica também foi canulada para viabilizar a obtenção das amostras de sangue durante os experimentos. Para os estudos de efluxo, o verapamil foi adicionado à solução de perfusão como inibidor de P-gp (glicoproteína-P), enquanto que o cetoconazol foi empregado como inibidor de enzimas CYP3A. Em modelo *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1, os experimentos foram conduzidos bidirecionalmente com o uso de GG918 como inibidor de P-gp. Em todos os experimentos realizados, o metoprolol e a ranitidina foram empregados como marcadores de alta e de baixa permeabilidade, respectivamente. Os resultados de permeabilidade mostraram que a estavudina e a zidovudina apresentam características de alta permeabilidade, enquanto a lamivudina apresentou o menor resultado dentre os três fármacos. Os ensaios bidirecionais em MDCK, no entanto, mostraram que os três antirretrovirais apresentam baixos valores de permeabilidade, uma vez que seus resultados foram significativamente menores que o valor encontrado para o metoprolol. Com relação à avaliação do mecanismo de efluxo, tanto a lamivudina quanto a zidovudina apresentaram interações significativas com a P-gp nos dois métodos empregados (perfusão *in situ* e MDCK-MDR1), uma vez que o aumento nos valores de permeabilidade foi constatado quando o inibidor de P-gp foi empregado. Os estudos de metabolismo intestinal realizados por meio do modelo de perfusão *in situ* mostraram que nenhum dos fármacos antirretrovirais apresentou interação significativa com as enzimas CYP3A quando o cetoconazol foi empregado como inibidor, uma vez que não foram constatadas mudanças significativas nos valores de permeabilidade. A comparação entre os resultados de permeabilidade efetiva (P_{ef}) e de permeabilidade aparente (P_{ap}), obtidos por meio da quantificação das amostras de perfusato e de plasma, respectivamente, permitiu verificar que as diferenças estatísticas entre estes dois

parâmetros podem indicar variados mecanismos de transporte, uma vez que a P_{ap} constata a quantidade da substância que realmente foi capaz de superar as barreiras físicas e bioquímicas presentes na parede do TGI. Logo, a P_{ap} é considerada um parâmetro mais próximo das condições *in vivo*. Esta diferença foi constatada apenas para a zidovudina nos ensaios de transporte de efluxo, uma vez que o valor médio de P_{ef} não representou a mesma conclusão fornecida pelo valor médio de P_{ap} . Os resultados obtidos permitiram concluir que os fármacos antirretrovirais apresentam permeabilidade de moderada a alta em função do possível envolvimento de carreadores de influxo. Além disso, os três fármacos antirretrovirais interagiram de alguma forma com a P-gp, sendo os resultados referentes à lamivudina e à zidovudina mais significativos. Embora tenha sido constatada o envolvimento da P-gp na permeabilidade da zidovudina, sua elevada fração absorvida indica que a absorção desta substância não é limitada por este mecanismo e que a ação do carreador de efluxo não é clinicamente relevante neste caso. Com relação aos estudos de metabolismo, a presença de enzimas CYP3A nos enterócitos também não representou uma condição desfavorável para a absorção dos antirretrovirais. Assim, a avaliação dos mecanismos no presente trabalho contribuiu para a caracterização biofarmacêutica da estavudina, lamivudina e zidovudina e as metodologias descritas podem ser empregadas nas etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico com o objetivo de assegurar a segurança e a eficácia de medicamentos.

Palavras-chave: perfusão *in situ*; efluxo; metabolismo; SCB; SCBDF; antirretrovirais.

ABSTRACT

DEZANI, T.M. **Evaluation of mechanisms involved in the permeability of antiretroviral drugs using the intestinal *in situ* perfusion model in rats.** São Paulo, 2017. 420p. Ph.D. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

For orally administered pharmaceutical products, the drug release from the dosage form and its absorption are considered important processes for adequate oral bioavailability. Thus, the solubility and permeability characteristics are extremely important for understanding of mechanisms related to the absorption in the scope of the ADME properties (absorption, distribution, metabolism and excretion). Based on that, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed as a tool for classifying drugs into four classes considering their solubility and permeability characteristics. In an additional way, the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) was proposed considering the solubility and metabolism of compounds. Besides, the BDDCS also considers the impact of transporters in biological tissues, such as in the gastrointestinal tract (GIT). Thus, this study aimed to evaluate the mechanisms involved in the permeability of antiretroviral drugs (stavudine, lamivudine and zidovudine) using the intestinal *in situ* perfusion model with mesenteric blood sampling in rats, considering efflux and intestinal pre-systemic metabolism that occur in the enterocytes. Furthermore, *in vitro* studies in cell cultures MDCK and MDCK-MDR1 were performed in order to elucidate the transport mechanisms of the drugs. For intestinal *in situ* perfusion studies, Wistar rats were anesthetized and a portion of jejunum was cannulated to allow the drug entry into the intestine, as well as the perfusate sampling at regular time intervals. The mesenteric vein was also cannulated to allow blood sampling during the experiments. For efflux studies, verapamil was used as P-gp (P-glycoprotein) inhibitor while ketoconazole was used as CYP3A inhibitor. In *in vitro* model MDCK and MDCK-MDR1, the experiments were performed bidirectionally using GG918 as P-gp inhibitor. For all experiments, metoprolol and ranitidine were used as markers of high and low permeability, respectively. Permeability results showed that stavudine and zidovudine present high permeability characteristics while lamivudine showed the lowest value. However, bidirectional studies in MDCK showed that the antiretroviral drugs present low permeability since their results are far from metoprolol's results. Regarding efflux studies, both lamivudine and zidovudine presented relevant interaction with P-gp in *in situ* perfusion and MDCK-MDR1 models, since the increase in permeability values was observed when P-gp inhibitor was added. Metabolism studies performed through intestinal *in situ* perfusion showed that none of antiretroviral drugs interact significantly with CYP3A enzymes, since that no variation in permeability results were noticed. Comparison between effective permeability (P_{eff}) and apparent permeability (P_{app}), obtained from perfusate and plasma, respectively, allowed to check that statistical differences between these two parameters can indicate different transport mechanisms, since P_{app} is related to the drug amount that really overcome the physical and biochemical barriers in the gut. Thus, P_{app} is considered the closest parameter to *in vivo* condition. This difference was observed for zidovudine in efflux studies, since P_{eff} values does not match with the conclusion provided by the P_{app} . The results obtained allowed to conclude that the antiretroviral drugs presents moderate to high permeability due to the involvement of influx carriers. Furthermore, the antiretroviral drugs interacted with the P-gp, but lamivudine and zidovudine showed significant results. Although the involvement between zidovudine and P-gp is observed, its high fraction absorbed indicates that the absorption is not limited by efflux transporter, which is not relevant clinically. Regarding

metabolism studies, CYP3A enzymes is not considered as a limiting condition for absorption of the antiretroviral drugs. Thus, the evaluation of the mechanisms contributes for biopharmaceutical characterization of stavudine, lamivudine and zidovudine and the methodologies used in this study can be applied in early drug development to ensure adequate safety and efficacy of pharmaceutical products.

Keywords: *in situ* perfusion; efflux; metabolismo; BCS; BDDCS; antiretroviral drugs.

OBJETIVO

Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de transporte envolvidos na permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais estavudina, lamivudina e zidovudina por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico e por meio do modelo *in vitro* com o emprego de culturas celulares MDCK e MDCK-MDR1, considerando os aspectos relacionados ao transporte de efluxo mediado pela glicoproteína-P e ao metabolismo pré-sistêmico intestinal mediado pelas enzimas CYP3A.

Objetivos específicos

- Realizar a análise crítica dos sistemas biofarmacêuticos de classificação mais difundidos na área de biofarmacotécnica (SCB e SCBDF) com destaque no desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações, bem como nos aspectos regulatórios para fins de bioisenção;
- Determinar a permeabilidade efetiva e a permeabilidade aparente dos fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico;
- Determinar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais por meio do modelo *in vitro* MDCK;
- Determinar a permeabilidade efetiva e a permeabilidade aparente dos fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência e na presença de inibidor de P-gp (verapamil) com a finalidade de avaliar a influência do mecanismo de efluxo;
- Determinar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais por meio do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 com a finalidade de avaliar a influência do mecanismo de efluxo;
- Determinar a permeabilidade efetiva e a permeabilidade aparente dos fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência e na presença de inibidor de CYP3A (cetoconazol) com a finalidade de avaliar a influência do metabolismo intestinal;

- Predizer, por meio de modelos matemáticos descritos na literatura, a permeabilidade e a fração absorvida em seres humanos com base nos resultados obtidos em ratos;
- Desenvolver e validar os métodos bioanalíticos empregados para a quantificação das diferentes amostras obtidas no presente trabalho (perfusato, plasma sanguíneo e soluções tampão).

CAPÍTULO 1: CONCEITOS GERAIS EM BIOFARMACOTÉCNICA

**1.1 A IMPORTÂNCIA DO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO
BIOFARMACÊUTICA (SCB) E DO SISTEMA DE
CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE DISTRIBUIÇÃO
DE FÁRMACOS (SCBDF) PARA O DESENVOLVIMENTO
FARMACÊUTICO E PARA OS PROCESSOS DE BIOISENÇÃO**

RESUMO

A via oral de administração é a rota mais comum para a maioria dos medicamentos comercializados nos dias de hoje. Uma vez administrado oralmente, o fármaco contido na forma farmacêutica precisa solubilizar-se adequadamente nos líquidos biológicos e, posteriormente, ser capaz de transpor a parede do trato gastrointestinal (TGI) a fim de atingir a circulação sanguínea e seu local de ação farmacológica. Desta forma, a solubilidade e a permeabilidade constituem duas importantes características que estão relacionadas à biodisponibilidade oral, embora outros fatores também estejam envolvidos. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que permite categorizar os fármacos em quatro classes distintas conforme suas características de solubilidade e de permeabilidade. Com base no SCB, a agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia dedicado aos processos de bioisenção de fármacos SCB classe I. Visto que a solubilidade está profundamente relacionada a diferentes processos vinculados às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), esta característica foi igualmente considerada em outro sistema designado Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF), o qual considera também a extensão de metabolismo na classificação de substâncias. O surgimento do SCB e do SCBDF estimulou o desenvolvimento de metodologias destinadas à caracterização da solubilidade, da permeabilidade e do metabolismo de substâncias com o objetivo de compreender fenômenos relacionados ao comportamento dos fármacos *in vivo*. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo apresentar o SCB e o SCBDF e destacar seus importantes papéis mediante os processos de caracterização de substâncias para o desenvolvimento de novos fármacos, novas formulações e para os processos de bioisenção. Alguns trabalhos publicados destacam a importância dos dois sistemas. Entretanto, a comparação entre o SCB e o SCBDF ainda trazem dúvidas em relação às suas contribuições efetivas nos estudos biofarmacêuticos. Assim, uma vez que o SCB corresponde a uma ferramenta mais simples, é possível classificar os fármacos com base no emprego de metodologias relativamente fáceis, as quais podem ser encontradas no guia publicado pela FDA. Por outro lado, a complexidade apresentada pelo SCBDF está vinculada a diferentes parâmetros não observados pelo SCB. Embora este sistema considere a permeabilidade e o SCBDF considere o metabolismo, é possível encontrar na literatura a relação entre estas duas características. Com base nisso, o SCB e o SCBDF formam juntos um importante instrumento científico que atuam de maneira complementar para contribuir para o entendimento dos fenômenos observados *in vivo* quando um fármaco é administrado oralmente.

Palavras-chave: absorção; metabolismo; permeabilidade; SCB; SCBDF; solubilidade.

INTRODUÇÃO

Muitos medicamentos disponíveis atualmente no mercado são destinados à administração por via oral em função da conveniência, baixo custo e simplicidade na adesão ao tratamento (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2016; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

O fármaco contido em uma forma farmacêutica sólida deverá, primeiramente, solubilizar-se nos líquidos biológicos para, em seguida, ser capaz de transpor as barreiras físicas e bioquímicas presentes no trato gastrointestinal (TGI). Somente assim, a substância estará apta a alcançar a corrente sanguínea e chegar ao seu sítio de atuação a fim de exercer sua ação farmacológica (REIS et al., 2013). Desta forma, embora haja outros fatores, as características de solubilidade e de permeabilidade estão diretamente relacionadas à biodisponibilidade do fármaco, a qual corresponde à uma propriedade que representa a velocidade e a extensão de absorção de uma substância e esta se torna disponível no sítio de ação (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BORCHARDT; SMITH; WILSON, 1996; BRIOSCHI et al., 2013; CDER/FDA, 2003; CHAUDHARY et al., 2012; DAS et al., 2012; DEZANI et al., 2016; OLIVARES-MORALES et al., 2014).

Com base na solubilidade e na permeabilidade de compostos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que permite a classificação dos fármacos em quatro categorias: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade); classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade); classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade). Além de auxiliar na predição da biodisponibilidade, o SCB também possui grande importância no desenvolvimento de novos compostos, novas formulações e nos processos de bioisenção, que corresponde à isenção de estudos *in vivo* de biodisponibilidade e bioequivalência para medicamentos que contêm fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (AMIDON et al., 1995; ANVISA/BRASIL, 2011; CDER/FDA, 2000, 2015a).

A notável relevância científica relacionada ao SCB incentivou a agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) a publicar um guia voltado para os processos de bioisenção de fármacos classe I oralmente administrados. Este documento descreve os procedimentos experimentais empregados na caracterização da solubilidade e da permeabilidade com o objetivo de classificação

biofarmacêutica. Atualmente, uma nova versão deste guia está sendo elaborada com atualizações referentes aos ensaios preconizados e deverá ser publicada em breve pela FDA (CDER/FDA, 2000, 2015b).

Além da solubilidade e da permeabilidade, outro fator que representa grande impacto na biodisponibilidade de fármacos é o metabolismo. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) constitui uma ferramenta adicional que vem ganhando grande notoriedade nos últimos anos. Assim como o SCB, o SCBDF também classifica os fármacos em quatro classes distintas: classe I (alta solubilidade e alto metabolismo); classe II (baixa solubilidade e alto metabolismo); classe III (alta solubilidade e baixo metabolismo) e classe IV (baixa solubilidade e baixo metabolismo). Este sistema é baseado no princípio em que fármacos que apresentam alta permeabilidade são também extensamente metabolizados. O SCBDF contribui ainda para a compreensão do comportamento *in vivo* de fármacos com base em parâmetros não previstos pelo SCB, tais como: interações fármaco-fármaco, interações fármaco-transportador e interações transportador-enzima (BENET, 2013; CUSTODIO; WU; BENET, 2008; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005).

Tanto o SCB quanto o SCBDF têm sido amplamente discutidos na literatura e suas finalidades relacionadas às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) ainda exigem esclarecimentos. Portanto, há a necessidade de compreender os conceitos e a importância de cada sistema. Além disso, é fundamental discutir a relação entre o SCB e o SCBDF e a relevância de cada um nos processos de bioislação de medicamentos e na predição da biodisponibilidade *in vivo* (CHEN; YU, 2009; CHEN et al., 2011).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo apresentar os principais sistemas de classificação de fármacos (SCB e SCBDF), compará-los e discutir suas finalidades em relação à classificação biofarmacêutica para fins de bioislação e desenvolvimento de fármacos.

Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

Em 1995, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores como uma ferramenta capaz de auxiliar no

desenvolvimento de novos fármacos, novas formulações e na predição da biodisponibilidade *in vivo*. Além disso, o SCB contribui para prever possíveis variáveis que podem influenciar a absorção, tais como: formulação; excipientes; alimentos; posologia; dentre outras. Este sistema se baseia no princípio de que o controle da extensão e a velocidade de absorção de um fármaco administrado por via oral depende basicamente das características de solubilidade e permeabilidade. Assim, o SCB classifica os fármacos em quatro classes distintas, conforme apresentado no Quadro 1.1 (AMIDON et al., 1995; BENET, 2013; CDER/FDA, 2000, 2015a; CHEN; YU, 2009; LENNERNÄS, 2007; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; PADE; STAVCHANSKY, 1998; VOLPE, 2008).

Quadro 1.1: Classificação biofarmacêutica dos fármacos de acordo com o SCB.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

(AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a)

É possível descrever as características e as limitações para cada classe biofarmacêutica apresentada no Quadro 1.1. Assim, fármacos classe I são caracterizados como substâncias que apresentam dissolução rápida e completa e sua extensão de absorção é maior que 90%, enquanto suas limitações estão relacionadas à dissolução e ao tempo de esvaziamento gástrico. Para substâncias classe II, a absorção é lenta e variável em função das dificuldades na sua solubilidade no TGI e as limitações se devem às variações fisiológicas e tipos de formulações. Já para fármacos classe III, tanto a velocidade quanto a extensão de absorção são variáveis em função das limitações relacionadas à permeabilidade, trânsito gastrintestinal e conteúdo luminal. Por fim, para compostos classe IV é importante destacar a alta variabilidade na velocidade e na extensão de absorção. Além disso, a baixa correlação *in vitro-in vivo* é frequentemente observada para estas substâncias devido a problemas de solubilidade e permeabilidade, variações

fisiológicas e variações nas formulações (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a; PADE; STAVCHANSKY, 1998).

Em relação aos fármacos classe I, o SCB representa uma importante ferramenta em relação aos processos de bioisenção, conforme brevemente mencionado. O grande objetivo da bioisenção é a substituição de ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* capazes de prever a biodisponibilidade a partir das características de solubilidade e permeabilidade dos fármacos. Desta forma, seus respectivos medicamentos podem ser candidatos à bioisenção, o que tem levado a recorrentes discussões acerca das metodologias empregadas na caracterização e na classificação biofarmacêutica de substâncias. Desta forma, os processos de bioisenção permitem diminuir a exposição de voluntários sadios, reduzir custos e limitar o tempo dedicado aos ensaios clínicos (ANVISA/BRASIL, 2011; BENET, 2013; CDER/FDA, 2000, 2015a; CHEN; YU, 2009; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

A grande repercussão causada pelo estabelecimento do SCB levou a agência reguladora FDA a publicar um guia destinado aos processos de bioisenção de fármacos classe I. De acordo com este documento, medicamentos que contenham fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis podem ser candidatos à bioisenção. Para tanto, além da elevada solubilidade e permeabilidade da substância ativa, a forma farmacêutica deverá, ainda, ser capaz de liberar mais de 85% do fármaco em até trinta minutos em ensaios de dissolução conduzidos sob faixa de pH fisiológico (de 1,0 a 7,5). Além disso, a extensão de absorção da substância deverá ser, no mínimo, 90% (CDER/FDA, 2000, 2015a; VOLPE, 2008).

Outra agência reguladora designada *European Medicines Agency* (EMA) também publicou um guia baseado no SCB. Neste caso, a extensão de absorção do fármaco deverá ser igual ou superior a 85% para fins de bioisenção (CPMP/EMA, 2010).

Desta forma, com base na FDA e na EMA, os medicamentos que contêm fármacos classe I podem ser candidatos à bioisenção quando a substância apresenta amplo índice terapêutico, é estável no TGI e possui alta solubilidade e alta permeabilidade. Além disso, sua forma farmacêutica correspondente deverá apresentar dissolução rápida e semelhante ao perfil de dissolução do medicamento de referência (CDER/FDA, 2000, 2015a; CPMP/EMA, 2010; VOLPE, 2008).

Os processos de bioisenção no Brasil também têm recebido grande destaque na área farmacêutica. A publicação da Resolução RDC nº37 de 3 de agosto de 2011 pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) descreve que os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência não são necessários aos medicamentos de liberação imediata ou de liberação retardada/prolongada com o mesmo mecanismo de liberação que contenham fármacos classe I. Em 2014, uma lista de substâncias cujos medicamentos podem ser candidatos à bioisenção foi também publicada pela ANVISA com base no SCB (ANVISA/BRASIL, 2011, 2014).

Segundo a FDA, um fármaco é altamente solúvel quando a sua maior dose prescrita é solúvel em até 250 mL de meio aquoso. Dois métodos são descritos para a caracterização da solubilidade: método do equilíbrio (*shake-flask*) e método potenciométrico. O método do equilíbrio é o mais empregado e é conduzido sob condições fisiológicas de temperatura (37°C) e pH (de 1,0 a 7,5). Já o método potenciométrico poderá ser realizado mediante justificativa que suporte sua capacidade de prever a solubilidade de um fármaco submetido ao estudo (CDER/FDA, 2000).

Diferentes modelos podem ser empregados para os estudos de permeabilidade de fármacos de acordo com a FDA. Esta característica pode ser determinada diretamente por meio da medida da taxa de transferência de massa através do intestino humano ou indiretamente por meio da previsão da absorção em estudos farmacocinéticos. Alternativamente, estudos de permeabilidade podem ser conduzidos em de diferentes modelos, tais como: modelos *in vitro* baseados em culturas celulares, modelos *ex vivo* com uso de segmentos intestinais isolados, estudos de perfusão *in situ* em animais ou de perfusão *in vivo* em seres humanos (CDER/FDA, 2000, 2015a; CHEN; YU, 2009; DAHAN et al., 2010).

Mediante a possibilidade da realização de experimentos de permeabilidade em diferentes modelos, é de suma importância destacar que os resultados obtidos podem variar quando dados são comparados entre metodologias diferentes. A padronização dos ensaios deverá ser inevitavelmente considerada. Além disso, a inclusão de substâncias marcadoras que indiquem a alta e a baixa permeabilidade deve ser levada em consideração nos estudos de permeabilidade independente do modelo empregado. Assim, é possível verificar se o método utilizado é capaz de diferenciar as características de alta e de baixa permeabilidade, o que assegura as condições de viabilidade e integridade do sistema escolhido. Substâncias como

metoprolol e ranitidina podem ser incluídas nos experimentos como marcadores, uma vez que o próprio guia da FDA traz uma lista de diferentes compostos e suas aplicações nos ensaios de permeabilidade (CDER/FDA, 2000).

Embora haja diferentes aplicações do SCB, este sistema considera apenas as características de solubilidade e de permeabilidade de fármacos para predizer a biodisponibilidade *in vivo*. Porém, esta propriedade depende de vários outros fatores atuantes no organismo, que podem interferir nas propriedades ADME. Assim, o metabolismo é de suma importância e interfere significativamente na biodisponibilidade de fármacos, o que não foi considerado pelo SCB. Deste modo, outro sistema proposto designado Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) teve como finalidade considerar outros parâmetros não previstos pelo SCB com o intuito de compreender com mais clareza o comportamento do fármaco *in vivo* frente às propriedades ADME, considerando também os fatores relacionados à farmacocinética.

Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF)

O SCBDF foi proposto em 2005 por Wu e Benet e considera a solubilidade e a extensão de metabolismo como dois importantes fatores que interferem na biodisponibilidade *in vivo* de um fármaco oralmente administrado (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005).

Este sistema é baseado no princípio de que fármacos extensamente metabolizados deverão ter sido amplamente absorvidos. Logo, estas substâncias são altamente permeáveis, o que as torna mais susceptíveis à ação das enzimas metabolizadoras. O SCBDF apresenta-se também como uma importante ferramenta que leva em consideração outros aspectos não previstos pelo SCB, tais como: interação fármaco-fármaco, interação fármaco-carreador e interação transportador-enzima (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Assim como o SCB, o SCBDF também classifica os fármacos em quatro classes distintas, conforme demonstrado no Quadro 1.2 (BENET, 2013; BENET et al., 2008; LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005).

Quadro 1.2: Classificação biofarmacêutica dos fármacos de acordo com o SCBDF.

Metabolismo extenso	Classe I	Classe II
	Alta solubilidade Metabolismo extenso	Baixa solubilidade Metabolismo extenso
Baixo metabolismo	Classe III	Classe IV
	Alta solubilidade Baixo metabolismo	Baixa solubilidade Baixo metabolismo

De acordo com o Quadro 1.2, fármacos classe I e II são extensamente metabolizados enquanto que os fármacos III e IV, por apresentarem baixo metabolismo, são primariamente eliminados de forma inalterada na urina ou na bile (HOSEY; CHAN; BENET, 2016; WU; BENET, 2005).

Inicialmente, a taxa de metabolização limítrofe foi estabelecida em 70% quando o SCBDF foi proposto (WU; BENET, 2005). Pouco tempo depois, estudos apontaram que a taxa igual ou maior que 90% parece ter sido mais adequada para identificar quando um fármaco é extensamente metabolizado. Esta observação foi baseada no metoprolol, o qual apresenta alta permeabilidade e alto metabolismo (fração absorvida e taxa de metabolismo superiores a 90%), sendo esta substância classificada como classe I tanto no SCB quanto no SCBDF. Assim, quando um fármaco apresenta extensão de metabolismo igual ou superior a 90%, sua absorção deverá ter sido também elevada (igual ou superior a 90%). Neste caso, o SCBDF poderia indiretamente contribuir para os processos de bioisenção de fármacos em substituição ao SCB (BENET et al., 2008; LARREGIEU; BENET, 2014).

Por outro lado, um trabalho recentemente publicado por Hosey, Chan e Benet (2016) indicou que um fármaco é extensivamente metabolizado quando sua taxa de metabolização é igual ou superior a 70%. Neste mesmo manuscrito, uma substância pouco metabolizada apresenta uma taxa de metabolização menor que 30% (HOSEY; CHAN; BENET, 2016). Estas porcentagens têm sido utilizadas como limítrofes na designação de um fármaco extensivamente metabolizado.

Além de apresentar-se como uma ferramenta alternativa aos processos de bioisenção, o SCBDF também tem grande aplicação para prever a influência de transportadores presentes em diferentes tecidos biológicos, inclusive o TGI. O Quadro 1.3 apresenta os efeitos causados pelos variados carreadores de acordo com a classe biofarmacêutica (BENET, 2013; WU; BENET, 2005). Neste caso, a interação entre um fármaco e um transportador pode também auxiliar na classificação biofarmacêutica de uma substância de acordo com o SCBDF.

Quadro 1.3: Influência de transportadores presentes em diferentes tecidos biológicos de acordo com a classe biofarmacêutica do SCBDF.

		Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Alta permeabilidade / extenso metabolismo		Classe I	Classe II
		Efeitos de transportadores de efluxo e influxo é mínimo no intestino e no fígado.	Efeitos de efluxo no intestino e efeitos de transportadores de influxo e/ou efluxo no fígado.
Baixa permeabilidade / baixo metabolismo		Classe III	Classe IV
		Efeitos de transportadores de influxo predominam, mas pode haver influência de transportadores de efluxo.	Efeito de transportadores de influxo e de efluxo são significativamente relevantes.

Conforme apresentado no Quadro 1.3, fármacos de classe I não são afetados pela ação de transportadores e, teoricamente, não necessitam ser estudados para avaliar a influência de carreadores, uma vez que o impacto clínico no tratamento farmacológico é mínimo. Entretanto, é de suma importância destacar o emprego de medicamentos que são prescritos para uso crônico, onde, neste caso, a investigação da influência de carreadores sobre as diferentes etapas relacionadas às propriedades ADME é altamente recomendada (interação fármaco-fármaco) (HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Fármacos que são oralmente administrados estão sujeitos a diferentes mecanismos em relação aos processos de absorção através do TGI. A substância poderá interagir em algum grau com os transportadores de influxo e de efluxo presentes nos enterócitos, além de interagir com as enzimas metabolizadoras também expressas na parede do TGI. Dependendo da significância de tais interações, grande impactos poderão ser observados na biodisponibilidade *in vivo* (BENET; CUMMINS; WU, 2004).

Estudos descritos na literatura apontam que a glicoproteína-P (P-gp) e as enzimas CYP3A atuam em conjunto para evitar a absorção de xenobióticos e de outras substâncias nocivas ao organismo. Quando um fármaco é substrato da P-gp, ocorre o seu transporte do interior dos enterócitos de volta para o lúmen intestinal. Isto evita que a mesma substância interaja diretamente com as enzimas CYP3A, evitando a saturação das mesmas e protegendo o organismo da entrada de compostos prejudiciais. Esta ação coordenada entre a P-gp e a CYP3A corresponde a um dos grandes fatores que interferem na absorção oral de fármacos substratos destas duas proteínas, o que é dificilmente previsto nos estudos realizados durante as etapas de desenvolvimento farmacêutico (BENET et al., 1996; BENET; CUMMINS; WU, 2004).

A classificação de fármacos de acordo com o SCBDF tem sido um grande desafio devido à complexidade deste sistema. Diferentes estudos descritos na literatura mostram a classificação biofarmacêutica com base em experimentos que empregam diferentes modelos. Em um estudo conduzido por Varma e colaboradores (2012), a classificação de substâncias de acordo com o SCBDF foi realizada por meio do emprego de culturas celulares MDCK-LE (*Madin-Darby canine kidney cells with low efflux*) e ensaios de solubilidade baseados em diferentes valores de pH. A correlação encontrada neste estudo foi de 84% na classificação das substâncias avaliadas (VARMA et al., 2012).

Estudos que são voltados para a caracterização da permeabilidade de fármacos podem, de alguma maneira, serem aproveitados para elucidar a extensão de metabolismo. Em experimento conduzido por meio de modelos *in vitro* e *in silico*, a permeabilidade de fármacos foi avaliada na tentativa de extrapolar os resultados encontrados para a extensão de metabolismo utilizando o lobetalol, a zidovudina e a teofilina como substâncias padrão dos estudos em Caco-2, MDCK e PAMPA, respectivamente (HOSEY; BENET, 2015; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Uma vez que a classificação biofarmacêutica de fármacos de acordo com o SCBDF ainda é desafiador, é possível encontrar uma lista com mais de 900 fármacos publicada por Benet, Broccatelli e Oprea (2011). Além disso, uma lista adicional com mais 175 fármacos foi recentemente publicada por Hosey, Chan e Benet (2016), o que permite ter uma ideia do comportamento *in vivo* do fármaco mediante as preconizações propostas pelo SCBDF (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Comparação entre SCB e SCBDF

De acordo com o que foi apresentado, o SCB corresponde a uma ferramenta que considera os três maiores fatores interferentes da biodisponibilidade: solubilidade, permeabilidade e dissolução. Os experimentos de solubilidade e de permeabilidade de um fármaco, bem como a condução de ensaios de dissolução, permitiram que este sistema fosse adotado pela FDA e pela EMA poucos anos após sua idealização (BREDA et al., 2009; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Com a publicação do guia voltado à bioisenção, muitos estudos de permeabilidade e solubilidade foram desenvolvidos para que medicamentos que contenham fármacos classe I pudessem ser bioisentos. Assim, características como a alta solubilidade, alta permeabilidade, elevada velocidade de dissolução e elevada fração absorvida asseguram a bioisenção de um produto farmacêutico, o qual não necessita ser submetido a estudos *in vivo* para estar disponível comercialmente (BENET, 2013).

Desta forma, os processos de bioisenção asseguram a qualidade dos medicamentos em países onde os recursos são mais escassos (BENET et al., 2008; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Uma vez que a permeabilidade depende diretamente da interação do fármaco com o tecido intestinal, a solubilidade, por sua vez, poderá ser melhorada por meio de diferentes técnicas a fim de favorecer a permeação e, conseqüentemente, a absorção de determinado composto. Assim, a possibilidade de estender a bioisenção para fármacos classe II e III tem sido discutida recentemente pela comunidade científica e pelas agências reguladoras com base em critérios a serem definidos para estas classes (uso de excipientes, velocidade

de dissolução, perfis de dissolução semelhantes aos produtos de referência e características como a acidez do fármaco) (CDER/FDA, 2000; CDER/FDA, 2015; CPMP/EMA, 2010).

Embora os estudos de solubilidade sejam relativamente simples, a caracterização da permeabilidade por meio do emprego de diferentes modelos constitui ainda um desafio, uma vez que variações metodológicas podem ser constatadas, bem como a divergência de resultados, o que, por sua vez, culmina em erros de classificação biofarmacêutica dos fármacos.

Em estudo conduzido por Dahan e colaboradores (2010), a permeabilidade do sotalol foi inferior a do metoprolol em função dos diferentes valores de pH empregados nos estudos de permeabilidade, o que pode contribuir para a classificação equivocada de substâncias de acordo com o SCB (DAHAN et al., 2010).

Embora a FDA recomende modelos para serem empregados na caracterização da permeabilidade, o uso isolado de cada método pode não permitir a conclusão exata sobre esta característica, uma vez que as substâncias dependem de diferentes fatores para transpor a parede do TGI. Desta forma, nem sempre tais fatores conseguem ser mimetizados por um único modelo. Porém, a associação de diferentes metodologias pode contribuir de maneira significativa para esclarecer os parâmetros estudados (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001; CHEN et al., 2011).

Ainda que o SCB possa ser considerado um sistema mais simples em comparação com o SCBDF, algumas dúvidas relacionadas às propriedades ADME ainda não podem ser solucionadas. Apesar dos guias publicados pela FDA e pela EMA, os estudos de permeabilidade realizados nem sempre fornecem resultados satisfatórios e conclusivos, uma vez que o mesmo modelo apresenta suas próprias vantagens e limitações.

Assim, o emprego do SCB e do SCBDF nos estudos biofarmacêuticos tem demonstrado que ambos os sistemas são complementares, uma vez que cada um tem um enfoque diferente para objetivos específicos (BENET, 2013).

Pela simplicidade oferecida pelo SCB, é possível afirmar que este sistema permite apenas prever a absorção de fármacos e, desta forma, assume que a biodisponibilidade oral pode ser predita com base nas características de

solubilidade e permeabilidade, as quais permitem que medicamentos que contenham fármaco classe I sejam bioisentos.

Por outro lado, o SCBDF apresenta-se como uma ferramenta bem mais complexa em comparação com o SCB e isso tem dificultado seu reconhecimento pelas agências reguladoras, embora indiretamente esse sistema identifique a possibilidade de bioisenção de um medicamento oralmente administrado. Muitos dos estudos de permeabilidade e transporte permitem classificar substâncias de acordo com o SCBDF. No entanto, como este sistema também considera a importância de outros órgãos que não o intestino (tais como fígado, rins e cérebro), a previsão da influência do metabolismo e da interação dos fármacos com transportadores ainda são difíceis de serem executados experimentalmente.

CONCLUSÃO

Desde o surgimento dos sistemas SCB e SCBDF, muitas metodologias foram desenvolvidas para prever o comportamento do fármaco *in vivo* por meio de estudos que pudessem ser facilmente conduzidos. Entretanto, muitos dos modelos utilizados atualmente não são capazes de fornecer conclusões satisfatórias a respeito da biodisponibilidade de fármacos oralmente administrados.

Inicialmente, muitas comparações foram feitas entre o SCB e o SCBDF. É de suma importância destacar que os propósitos considerados por cada sistema possuem enfoques diferentes. Porém, as duas ferramentas apresentam-se relevantes para serem aplicadas nas etapas de desenvolvimento farmacêutico e nos processos de bioisenção de fármacos classe I, o que permite reduzir custos e tempo necessários para a condução de ensaios clínicos.

A importância da caracterização da solubilidade e da permeabilidade para prever a biodisponibilidade *in vivo* é sugerida pelo SCB. Entretanto, outras características relacionadas ao metabolismo de fármacos no organismo devem também ser consideradas, conforme preconizado pelo SCBDF.

A comparação feita entre o SCB e o SCBDF leva a concluir que ambos os sistemas são complementares e contribuem com visões diferenciadas a respeito do comportamento do fármaco *in vivo* quando este é administrado por via oral, o que permite também investigar fatores mais complexos como as interações entre fármacos, entre fármaco e carreador e a relação entre transportadores de efluxo e enzimas.

Para o desenvolvimento farmacêutico de novas moléculas, novas formulações e nos processos de bioisenção, o emprego das duas ferramentas pode, de fato, contribuir para a elucidação da biodisponibilidade *in vivo* com menores custos e em menor tempo.

Assim, uma vez que o SCB é mais simples e o SCBDF é mais complexo, foi possível perceber que o primeiro sistema é mais objetivo ao permitir que ensaios de solubilidade e permeabilidade prevejam a biodisponibilidade *in vivo*. Por outro lado, o SCBDF parece estar mais relacionado às condições fisiológicas do que o SCB (BENET, 2013). Portanto, mais experimentos não necessários a fim de construir uma sequência de triagem experimental que permita que o SCBDF se torne ainda mais usual.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANVISA/BRASIL. Resolução - RDC n. 37, de 3 de agosto de 2011. [s.l: s.n.].

ANVISA/BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN No 7, DE 21 DE AGOSTO DE 2014 Determina Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). [s.l: s.n.].

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1PII of original article: S0169-409X(96)00415-2. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 22 (1996) 67–84.1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BENET, L. Z. et al. Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 2–3, p. 139–143, 1996.

BENET, L. Z. et al. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 3, p. 483–488, 2008.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, n. 1–2, p. 3–9, 2004.

BORCHARDT, RONALD T.; SMITH, P. L.; WILSON, G. **Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism**. New York: Springer, 1996. v. 8

BREDA, S. A. et al. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 106–113, 2009.

BRIOSCHI, T. M. D. L. S. et al. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of cyclobenzaprine tablets. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. [s.l: s.n.].

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, 2015a.

CDER/FDA. FDA Approved Drug Products. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=DIDANOSINE>>. Acesso em: 1 jan. 2015b.

CHAUDHARY, A. et al. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v. 2, n. 1, p. 32–67, 2012.

CHEN, M.-L.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability (dagger). **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 74–81, 2009.

CHEN, M. L. et al. The BCS, BDDCS, and regulatory guidances. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 7, p. 1774–1778, 2011.

CPMP/EMA. Guideline on the investigation of bioequivalence European Medicines Agency. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:GUIDELINE+ON+THE+INVESTIGATION+OF+BIOEQUIVALENCE#0>>.

CUSTODIO, J. M.; WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 717–733, 2008.

DAHAN, A. et al. High-permeability criterion for BCS classification: Segmental/pH dependent permeability considerations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1827–1834, 2010.

DAS, S. K. et al. Solid Dispersions : An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. **International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2012.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

HOSEY, C. M.; BENET, L. Z. Predicting the Extent of Metabolism Using in Vitro Permeability Rate Measurements and in Silico Permeability Rate Predictions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1456–1466, 2015.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1335–44, 2014.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3–12, 2000.

OLIVARES-MORALES, A. et al. The use of ROC analysis for the qualitative prediction of human oral bioavailability from animal data. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 3, p. 720–730, 2014.

PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 12, p. 1604–1607, 1998.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

VARMA, M. V. et al. PH-dependent solubility and permeability criteria for provisional biopharmaceutics classification (BCS and BDDCS) in early drug discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 1199–1212, 2012.

VOLPE, D. A. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: **Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. N: Springer, 2008. v. VIIp. 665–680.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

1.2   MODELO DE PERFUSÃO *IN SITU* EMPREGADO NOS ESTUDOS DE PERMEABILIDADE, TRANSPORTE E METABOLISMO INTESTINAL DE FÁRMACOS¹

---

¹ O material apresentado neste capítulo foi baseado na publicação do artigo:

DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; SILVA, M.M.C.; SERRA, C.H.R. In situ intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v.17, p.746-757, 2017.

RESUMO

Em 1995, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores como uma ferramenta que considera dois importantes parâmetros em relação à absorção de fármacos: solubilidade e permeabilidade. Desde então, diferentes métodos destinados à avaliação destas características foram desenvolvidos para prever a absorção *in vivo* de substâncias. Nos últimos anos, os estudos de permeabilidade realizados por meio de variados modelos têm recebido grande destaque científico. Todavia, a interação entre um fármaco e a membrana biológica pode não ser suficiente para prever o comportamento da substância *in vivo*. Assim, diferentes métodos empregados para avaliar a permeabilidade são atualmente utilizados para estudos de mecanismos de transporte com a finalidade de investigar o envolvimento de carreadores e as possíveis rotas relacionadas aos processos de absorção oral. Além disso, estudos que objetivam avaliar a influência do metabolismo pré-sistêmico intestinal têm sido cada vez mais o foco de pesquisas recentes. Com base nessa ideia, Wu e Benet propuseram uma nova ferramenta denominada Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF), a qual permite a classificação de substâncias em quatro classes distintas de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Dentre os variados métodos atualmente empregados nos estudos de permeabilidade, o modelo de perfusão *in situ* é considerado o mais próximo das condições *in vivo* em função de vantagens como suprimento sanguíneo e inervação, os quais permanecem intactos durante todo o período de experimento. Assim, o presente trabalho de revisão teve como objetivo apresentar o modelo de perfusão *in situ* e sua aplicação nos estudos de permeabilidade, transporte e metabolismo intestinal de fármacos. Além disso, são também apresentadas as discussões acerca da classificação de substâncias segundo o SCB e o SCBDF por meio do emprego do modelo de perfusão *in situ*. Desta forma, os estudos realizados neste modelo possibilitam a obtenção de dois parâmetros indicadores da velocidade de permeação através da parede do trato gastrointestinal (TGI): permeabilidade efetiva (P_{ef}) e permeabilidade aparente (P_{ap}). Pesquisas recentes têm demonstrado que a P_{ap} apresenta-se como um importante resultado sobre a caracterização da permeabilidade de um fármaco, uma vez que a obtenção desta medida é baseada na quantidade da substância presente no sangue mesentérico e que realmente foi absorvida após superar as barreiras físicas e bioquímicas presentes nos enterócitos. Portanto, os resultados de P_{ap} representam com maior fidedignidade a etapa de absorção, a qual pode estar diretamente relacionada às variações observadas na biodisponibilidade que muitas vezes não são esclarecidas por meio de estudos farmacocinéticos.

Palavras-chave: metabolismo intestinal; perfusão *in situ*; permeabilidade; SCB; SCBDF; transporte.

INTRODUÇÃO

Em 1995, Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como uma ferramenta que auxilia nas etapas de desenvolvimento farmacêutico. O SCB é baseado no princípio de que a substância administrada oralmente necessita apresentar elevada solubilidade aquosa e alta permeabilidade através das membranas biológicas para que ocorra uma adequada biodisponibilidade oral. Assim, os fármacos podem ser classificados em quatro classes: (I) alta solubilidade e alta permeabilidade; (II) baixa solubilidade e alta permeabilidade; (III) alta solubilidade e baixa permeabilidade e (IV) baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015b).

Em 2000, a agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) adotou o SCB para fins de bioisenção de medicamentos que contenham fármacos classe I. Desde então, este sistema é considerado no desenvolvimento de novas moléculas candidatas a fármacos e novas formulações farmacêuticas. Além disso, vários métodos foram desenvolvidos recentemente para a realização de estudos de solubilidade e de permeabilidade, os quais são descritos no guia para bioisenção publicado pela FDA (CDER/FDA, 2000, 2015b).

Atualmente, linhagens celulares como Caco-2 (células obtidas de adenocarcinoma humano) têm sido amplamente utilizadas em indústrias farmacêuticas para selecionar compostos com potencial farmacológico. Contudo, o emprego deste modelo *in vitro* pode subestimar ou superestimar a absorção de um fármaco devido à expressão irregular de transportadores, falta de camada de muco e baixos níveis intracelulares de enzimas CYP (citocromo P450). Além disso, a absorção local-dependente não pode ser avaliada, bem como a interação enzima-transportador (*enzyme-transporter interplay*) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; KOLJONEN et al., 2008).

O longo período de cultivo (21 dias) levou alguns pesquisadores a desenvolver protocolos alternativos que possibilitassem a diminuição do tempo requerido para o crescimento celular. Neste caso, o estabelecimento de uma nova metodologia experimental para o cultivo de células em estudos de permeabilidade e transporte necessita de uma adequada validação do método e uma boa correlação entre os resultados obtidos a partir do protocolo proposto e os resultados provenientes de estudos *in vitro* já estabelecidos na literatura (CAI et al., 2014; PENG et al., 2014; SEVIN et al., 2013).

Dentre os diferentes métodos destinados aos estudos de permeabilidade intestinal, o modelo de perfusão *in situ* é considerado promissor e vem sendo amplamente empregado na avaliação da permeabilidade de fármacos em função da sua proximidade com as condições *in vivo*, tais como: suprimento sanguíneo e inervação preservados e a presença de carreadores e enzimas ativos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2016).

Embora o guia de bioisenção da FDA descreva as condições padronizadas para a realização dos ensaios de permeabilidade, alguns métodos podem não ser adequados para prever a absorção *in vivo*. A execução de ensaios por meio do modelo de perfusão *in situ* com um protocolo experimental robusto pode auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos no transporte de um fármaco através da parede do trato gastrointestinal (TGI), bem como permitir a avaliação da influência do metabolismo pré-sistêmico sobre a biodisponibilidade *in vivo* (CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016).

A presença de enzimas no sítio de absorção pode ser responsável pela biodisponibilidade incompleta constatada para alguns fármacos, o que resulta na redução do efeito terapêutico. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto por Wu e Benet (2005) como uma ferramenta complementar ao SCB e considera as características de solubilidade e metabolismo da substância. Assim como o SCB, o SCBDF também classifica os fármacos em quatro classes: (I) alta solubilidade e metabolismo extenso; (II) baixa solubilidade e metabolismo extenso; (III) alta solubilidade e baixo metabolismo e (IV) baixa solubilidade e baixo metabolismo (WU; BENET, 2005).

Com base no exposto, o presente trabalho de revisão teve como objetivo apresentar o modelo de perfusão *in situ* e sua aplicação em estudos de permeabilidade, transporte e metabolismo intestinal. Além disso, são também apresentadas as discussões acerca da classificação de substâncias segundo o SCB e o SCBDF por meio do emprego do modelo de perfusão *in situ*.

Estudos de Permeabilidade

Embora os dados de permeabilidade de fármacos obtidos por meio de estudos em seres humanos sejam considerados extremamente relevantes em

comparação com os experimentos *in vitro*, as dificuldades em obter resultados *in vivo* envolvem várias questões relacionadas aos aspectos burocráticos, éticos e financeiros (LOZOYA-AGULLO et al., 2015).

Conforme brevemente mencionado, diferentes métodos experimentais podem ser empregados nos estudos de permeabilidade, transporte e metabolismo intestinal. O modelo de perfusão *in situ* tem sido amplamente utilizado para este fim nos últimos anos. Originalmente proposto por Schanker e colaboradores (1958), este método apresenta facilidades na técnica cirúrgica, é relativamente simples e possibilita a avaliação da permeabilidade intestinal para prever a cinética de absorção de fármacos oralmente administrados (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; RATHORE et al., 2008; SCHANKER et al., 1958; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Para a grande maioria dos fármacos disponíveis comercialmente, o transporte passivo transcelular constitui a principal via para a absorção de substâncias através da parede do TGI. Estudos descritos na literatura destacam a boa correlação existente entre os diferentes modelos disponíveis para os estudos de permeabilidade. Em contrapartida, quando o fármaco possui interação significativa com transportadores ou com enzimas metabolizadoras, a correlação é diminuída (CAO et al., 2006; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996).

A correlação da biodisponibilidade oral entre ratos e seres humanos foi estudada para 48 substâncias e não foi observada uma boa correlação ($r^2=0,29$) (CAO et al., 2006). Provavelmente, a interação entre fármaco e transportadores e/ou enzimas pode explicar a baixa correlação observada. Em outro estudo, uma baixa correlação foi constatada para a biodisponibilidade de 35 fármacos entre macacos e seres humanos ($r^2=0,502$). A similaridade nas condições morfológicas e fisiológicas pode explicar essa correlação (CHIOU; BUEHLER, 2002). Em geral, como o transporte passivo transcelular constitui a principal via para a absorção oral de um fármaco, as variações no espaço paracelular, expressão de transportadores e a presença de enzimas podem estar relacionadas às diferenças entre as espécies.

Entretanto, em estudo realizado com 17 substâncias, a permeabilidade intestinal foi avaliada por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos e em seres humanos. Uma variedade de fármacos foi escolhida para assegurar diferentes rotas de permeação, como processos mediados por carreadores e difusão passiva. Os resultados mostraram que a permeabilidade em ratos foi de 5 a 10 vezes menor

que a permeabilidade em seres humanos. Foi encontrada ainda uma correlação razoável tanto para os fármacos carregados quanto para os passivamente difundidos ($r^2=0,7$) (CAO et al., 2006). Além disso, quando o verapamil (substrato de P-gp) foi excluído, a correlação aumentou ($r^2=0,8$). Assim, as diferenças entre espécies na expressão de transportadores podem justificar a baixa correlação relatada na literatura entre ratos e seres humanos quando substratos de carregadores são avaliados.

Com base nos estudos descritos acima e na constatação dos efeitos de transportadores nos processos de absorção de fármacos, é importante destacar que a influência de carregadores também é considerada pelo SCBDF. Desta forma, o efeito da interação entre fármacos classe I e transportadores é mínimo clinicamente, uma vez que a correlação destas substâncias entre ratos e seres humanos é elevada (CAO et al., 2006; CHIOU; BARVE, 1998; DEZANI et al., 2016; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; KIM et al., 2006; LENNERNÄS, 2007; WU; BENET, 2005).

Em 2015, um estudo publicado por Lozoya-Agullo e colaboradores (2015) comparou duas técnicas diferentes utilizadas para a permeabilidade intestinal: SPIP (*Single-Pass Intestinal Perfusion*) e método de perfusão de Doluisio. A permeabilidade em ratos foi avaliada para um conjunto de 15 fármacos, incluindo substâncias de baixa, moderada e alta permeabilidade, bem como compostos passivamente e ativamente transportados. A correlação entre ambas as técnicas e a fração absorvida predita para seres humanos (F_a) foram avaliadas. Uma excelente correlação entre os dois métodos experimentais ($r^2=0,93$) foi constatada e os valores de F_a também estavam de acordo com os valores relatados na literatura (LOZOYA-AGULLO et al., 2015).

Com base nos bons resultados de correlação, a perfusão intestinal *in situ* é utilizada para investigar o envolvimento de transportadores e enzimas nos processos de permeação e metabolismo pré-sistêmico de fármacos.

Alguns pesquisadores estudaram a absorção intestinal de fármacos por meio de modificações no procedimento original de perfusão *in situ*. Na literatura, cinco variações da técnica podem ser encontradas: oscilação de perfusato; recirculação de perfusato; método de circuito fechado; perfusão de passagem simples e perfusão de passagem tripla. A Figura 1.1 representa as diferentes técnicas relacionadas à perfusão *in situ* (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DAHAN;

WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013; SCHURGERS et al., 1986).

No procedimento de oscilação de perfusato, o fármaco é perfundido para o interior do intestino de uma maneira bidirecional (SCHURGERS et al., 1986; SCHURGERS; DE BLAEY, 1984). A técnica de recirculação de perfusato consiste na introdução do fármaco no intestino de uma maneira unidirecional e o fluido obtido ao final do percurso retorna ao mesmo recipiente de onde partiu (KATO et al., 2008; SCHURGERS et al., 1986; TSUJI et al., 1978; VAN REES; DE WOLFF; NOACH, 1974). No método de circuito fechado, o segmento intestinal é completamente isolado com o fármaco em seu interior. As amostras, neste caso, são obtidas em intervalos regulares de tempo (DOLUISIO et al., 1969; SCHURGERS et al., 1986; STAPPAERTS et al., 2015). Já no procedimento de perfusão de passagem simples, o fármaco é introduzido no intestino a um fluxo contínuo e as amostras são obtidas a partir da porção distal em intervalos regulares de tempo (AMIDON et al., 1981; DEZANI et al., 2016; KOMIYA et al., 1980; REIS et al., 2013). Na perfusão de passagem tripla, três porções do intestino são simultaneamente canuladas (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; SCHURGERS et al., 1986).

Figura 1.1: Tipos de perfusão *in situ*: (A) oscilação de perfusato; (B) recirculação de perfusato; (C) perfusão de passagem simples; (D) método de circuito fechado e (E) perfusão de passagem tripla (adaptado de DAHAN, WEST, AMIDON, 2009; SCHURGERS et al., 1986).

P = bomba peristáltica; *R* = recipiente contendo o fármaco solubilizado; 1 = entrada da solução de perfusão; 2 = saída do perfusato.

Perfusão *in situ* de passagem simples (Single-Pass Intestinal Perfusion, SPIP)

A perfusão *in situ* de passagem simples ou única (*Single-Pass Intestinal Perfusion*, SPIP) representa um importante modelo empregado na predição da absorção *in vivo*, na classificação biofarmacêutica de fármacos, nos estudos de absorção local-dependente, na avaliação dos mecanismos de transporte e na investigação das interações fármaco-fármaco, fármaco-transportador e transportador-enzima (*transport-enzyme interplay*) (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016).

A técnica de SPIP consiste na introdução do fármaco em uma porção específica do intestino, o qual é cuidadosamente canulado de modo a preservar o fornecimento de sangue e a inervação local. O desaparecimento da substância da

solução de perfusão é atribuído à permeabilidade, a qual é expressa como permeabilidade efetiva (P_{ef}). Este parâmetro se refere à diferença entre as concentrações do fármaco na porção proximal e na porção distal do segmento canulado. No entanto, a P_{ef} não representa necessariamente a quantidade de fármaco que passou para a corrente sanguínea. Fatores como adsorção da substância avaliada aos componentes da bomba peristáltica e a ocorrência de metabolismo e/ou degradação podem ser erroneamente interpretados como absorção (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2007; STAPPAERTS et al., 2015; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001; VOLPE, 2010).

Nos últimos anos, o método de perfusão *in situ* com amostragem sanguínea tem sido empregado em estudos de permeabilidade de fármacos com o objetivo de obter resultados ainda mais próximos dos dados *in vivo*. O desaparecimento da substância da solução de perfusão e seu aparecimento na corrente sanguínea adjacente são monitorados por meio de coletas sucessivas de sangue mesentérico durante a execução dos experimentos. A partir desta adaptação experimental, é possível obter os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap}) (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; GRASS, 1997; STAPPAERTS et al., 2015).

Cummins e colaboradores (2003) conduziram um estudo para investigar a modulação do metabolismo intestinal pela CYP3A e pela P-gp. Para isso, ratos foram utilizados nos estudos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. A reposição do volume sanguíneo foi realizada através da veia jugular, conforme esquema demonstrado na Figura 1.2 (CUMMINS et al., 2003).

Brouwers e colaboradores (2010) também estudaram o modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico para avaliar a permeabilidade intestinal de fármacos (atenolol, talinolol e propranolol) na ausência e presença de inibidor de carreador de efluxo. Em duas horas de experimento, não foram constatadas diferenças entre os mecanismos como transporte ativo, difusão passiva paracelular e difusão passiva transcelular (BROUWERS et al., 2010).

Figura 1.2: Esquema representativo do ensaio de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. A reposição do volume sanguíneo é realizada através da veia jugular (Adaptado de (CUMMINS et al., 2003).

P = bomba peristáltica

Condições gerais empregadas nos ensaios de perfusão *in situ*

Os experimentos de perfusão *in situ* são geralmente realizados em animais pequenos, tais como camundongos, ratos e coelhos. Por este motivo, é importante considerar variáveis importantes como sexo, peso, idade e espécie animal, duração do jejum, protocolo anestésico, tempo para o fármaco atingir o equilíbrio com a parede intestinal, porção intestinal selecionada para o estudo, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão e o fluxo de perfusão (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; GRASS, 1997; RATHORE et al., 2008; VOLPE, 2010; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

Embora o uso de anestesia em animais seja comum no modelo de perfusão *in situ*, algumas funções (neural, endócrina e linfática) e o suprimento sanguíneo são preservados durante todo o período experimental. Tais características interferem significativamente nos valores de permeabilidade (JAIN et al., 2007; RATHORE et al., 2008; VOLPE, 2008; ZAKERI-MILANI et al., 2009). O Quadro 1.4 apresenta as principais variáveis e condições empregadas nos estudos de perfusão *in situ* reportados na literatura.

Quadro 1.4: Principais variáveis e condições experimentais relacionadas aos estudos de perfusão *in situ* reportados na literatura.

Características	Condições	Referências
Espécie e sexo	Ratos machos Wistar ou Sprague-Dawley	1-5
Peso (g)	200-300	1-5
Período de jejum (h)	12-18	1-3, 5
Protocolo anestésico	pentobarbital (50-60 mg/kg) cetamina-xilazina (60-87 mg/kg e 7-8 mg/kg, respectivamente) Uretano (30 mg/kg) Isoflurano (2%)	1, 3-10
Segmento intestinal e comprimento	Jejuno (10-15 cm) Íleo Cólon	1, 3-5
Tempo para o equilíbrio (min)	30 60	1, 3-5
Composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão	-Tampão fosfato (pH 6,5) -Tampão MES, NaCl, KCl, vermelho de fenol (pH 6,5) -Tampão MES, NaCl, KCl, vermelho de fenol ou PEG 4000 (pH 6,5, 290 mOsm/L) -NaCl, KCl, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, manitol, polietilenoglicol, D-glicose (pH 6,5, 290 mOsm/L) -NaCl, KCl, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, D-glicose (pH 7,4, 200-250 mOsm/L) -Tampão fosfato, KCl, NaCl, manitol, D-glicose, PEG 4000 (pH 6,5, 290 mOsm/L)	1, 3-7, 11-13

(Continua)

(Continuação)

Fluxo da solução de perfusão (mL/min)	0,2 0,5	1-3
Método para avaliar a taxa de fluxo de água	Marcador não absorvível e método gravimétrico	1, 3, 4, 8
Intervalo de tempo para coletas (min)	5-15	1, 2, 6-9, 11-14
Tempo total de experimento (min)	60-120	1, 2, 6-9, 11-14

(1) (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009); (2) (ZAKERI-MILANI et al., 2009); (3) (DAHAN; AMIDON, 2009a); (4) (MASAOKA et al., 2006); (5) (DEZANI et al., 2016); (6) (RATHORE et al., 2008); (7) (KIM et al., 2006); (8) (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001); (9) (LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006); (10) (LI et al., 2011); (11) (JAIN et al., 2007); (12) (BERGGREN et al., 2004); (13) (ERIKSSON et al., 2010); (14) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Os ratos empregados no modelo de perfusão *in situ* são anestesiados e colocados em superfícies aquecidas (37°C) para favorecer o controle da condição anestésica durante os experimentos. Em seguida, uma abertura longitudinal no abdômen é realizada para acessar o intestino e o segmento é selecionado para canulação cuidadosa em ambas as extremidades (porções proximal e distal) para evitar danos ao sistema sanguíneo e inervação. O fármaco na solução de perfusão é, então, perfundido para o interior do intestino na porção proximal enquanto que as amostras de perfusato são coletadas a partir da região distal. Afim de evitar o ressecamento dos tecidos e manter a temperatura do animal durante todo o tempo do experimento, a cavidade abdominal exposta é constantemente umedecida com solução salina aquecida a 37±1°C (BERGGREN et al., 2004; CUMMINS et al., 2003; DAHAN; AMIDON, 2009a; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; ERIKSSON et al., 2010; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; LI et al., 2011; RATHORE et al., 2008; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Para a concentração de um fármaco na solução de perfusão, a dose prescrita mais elevada é normalmente considerada e dividida pelo volume de 250 mL de meio aquoso. Este volume é normalmente recomendado para a administração oral de medicamentos em estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (CDER/FDA, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; KIM et al., 2006).

A solução de perfusão deve ser adicionada no interior do intestino a um fluxo constante por meio de uma bomba peristáltica (BERLIOZ et al., 1999; BROUWERS et al., 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; JAIN et al., 2007). Em um primeiro instante, a solução de perfusão isenta de fármaco (branco) é perfundida durante um período de tempo estabelecido (normalmente 0,5 mL/min durante 30 min) e, em seguida, o fármaco solubilizado é perfundido a um fluxo de 0,2 mL/min. Tal fluxo deverá ser mantido para preservar as condições fisiológicas e evitar alterações nas características morfológicas, na camada de água estacionária (CAE) e na camada de muco (ANNAERT et al., 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; MORISHITA et al., 2007).

A CAE constitui uma camada de água, muco e glicocálice adjacente à superfície apical da parede do intestino e pode atuar como uma barreira física à absorção de substâncias. Dependendo da espessura desta camada, a permeabilidade de um fármaco através do TGI pode ser variada dependendo das características de lipofilicidade e solubilidade (DEZANI et al., 2016; FAGERHOLM; LENNERNÄS, 1995; REIS; SINKÓ; SERRA, 2010; THOMSON et al., 1983).

Ao final dos experimentos, os animais são eutanasiados com a administração de solução saturada de cloreto de potássio por via intracardíaca e, em seguida, os segmentos intestinais empregados nos estudos são removidos para realizar as medições do comprimento e do raio (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; JAIN et al., 2007; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

A viabilidade não é normalmente discutida para os estudos de perfusão *in situ*, pois o animal empregado nestes experimentos permanece vivo durante todo o período do ensaio. No entanto, alguns cuidados nos procedimentos cirúrgicos (canulação, isolamento do segmento intestinal e manutenção do fluxo de perfusão) podem evitar o comprometimento da viabilidade e da integridade do intestino.

Para a avaliação dessas condições, o emprego de substâncias marcadoras com permeabilidade conhecida deve ser considerado. Assim, os experimentos de

perfusão *in situ* são divididos em duas etapas: estudo com os marcadores de alta e de baixa permeabilidade e estudo com o fármaco a ser avaliado.

Cálculos dos parâmetros relacionados ao modelo de perfusão *in situ*

Durante a realização dos estudos de perfusão *in situ* é essencial considerar o efeito da absorção e/ou secreção de água que ocorre continuamente ao longo do lúmen intestinal. Este mecanismo pode causar erros na concentração do fármaco nas amostras de perfusato (LANE; LEVIS; CORRIGAN, 2006; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Com a finalidade de corrigir a concentração da substância presente no lúmen, dois métodos que possibilitam tal correção são reportados na literatura: o método gravimétrico e o método que envolve a coadministração de uma substância não absorvível, como o vermelho de fenol, inulina ou ^{14}C -PEG-4000 (radiomarcado) (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; KIM et al., 2006; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Para o método com a coadministração de uma substância não absorvível, a correção da concentração do fármaco é calculada pela Equação 1.1 (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; KIM et al., 2006; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

$$C_{saída\ corrigida} = \frac{C_{saída} \cdot [marcador_{entrada}]}{[marcador_{saída}]}$$

Equação 1.1

onde: $C_{saída\ corrigida}$ é a concentração do fármaco corrigida na saída do segmento intestinal; $C_{saída}$ é a concentração do fármaco na saída do segmento intestinal; $[marcador_{entrada}]$ é a concentração da substância não absorvível na entrada do segmento intestinal (porção proximal); e $[marcador_{saída}]$ corresponde à concentração da substância não absorvível na saída do segmento intestinal (porção distal).

Para o método gravimétrico, a correção da concentração do fármaco presente no lúmen intestinal é calculada de acordo com a Equação 1.2. Este procedimento consiste em pesar o perfusato coletado e, através do valor da

densidade da solução, é possível obter o volume correspondente ao fluxo utilizado (JAIN et al., 2007; MAHER et al., 2009; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

$$C_{saída\ corrigida} = C_{saída} \cdot \frac{Q_{saída}}{Q_{entrada}}$$

Equação 1.2

onde: $C_{saída\ corrigida}$ é a concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal (porção distal); $C_{saída}$ corresponde à concentração do fármaco na saída do segmento intestinal (porção distal); $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada (porção proximal) da solução de perfusão; e $Q_{saída}$ é o fluxo de saída da solução de perfusão.

Sutton, Rinaldi e Vukovsky (2001) compararam o uso de dois métodos de correção da concentração do fármaco na saída do segmento intestinal ($C_{saída\ corrigida}$): o método gravimétrico e o método que emprega substância não absorvível. Os autores constataram que ambos os procedimentos apresentaram uma precisão satisfatória. Porém, o método gravimétrico foi considerado melhor, uma vez que não é necessária a adição de uma substância não absorvível na solução de perfusão, o que evita interferências nos estudos de permeabilidade (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Em relação à absorção e secreção de água no lúmen intestinal, outra equação é utilizada para permitir a obtenção dos valores da TFA (taxa de fluxo de água) durante os experimentos de perfusão *in situ*. A TFA é calculada pela Equação 1.3, onde valores positivos indicam absorção de água a partir do lúmen intestinal e valores negativos indicam o oposto (SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{saída}}{Q_{entrada}} \right) \right] \frac{Q_{entrada}}{l}$$

Equação 1.3

onde: TFA é a taxa de fluxo de água, $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada da solução de perfusão; $Q_{saída}$ é o fluxo de saída da solução de perfusão em um intervalo de tempo específico; e l corresponde ao comprimento do segmento intestinal.

No modelo de perfusão *in situ*, o estudo da permeabilidade de um fármaco começa após o período de equilíbrio, ou seja, após a substância entrar em equilíbrio com a parede do TGI. Esta etapa geralmente dura de 30 a 60 minutos e é seguida pelas coletas das amostras de perfusato, as quais permitem a obtenção dos valores de P_{ef} calculados por meio da Equação 1.4 (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; ERIKSSON et al., 2010; JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2007; KIM et al., 2006).

$$P_{ef} = - \frac{Q_{entrada}}{A} \cdot \ln \left(\frac{C_{saída\ corrigida}}{C_{entrada}} \right)$$

Equação 1.4

onde: P_{ef} corresponde à permeabilidade efetiva do fármaco, $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada da solução de perfusão no segmento intestinal; A é a área ($2\pi Rl$) disponível para absorção intestinal considerando o comprimento (l) e o raio (R); $C_{saída\ corrigida}$ é a concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal; e $C_{entrada}$ é a concentração do fármaco na entrada do segmento intestinal (DEZANI et al., 2016; JUNIOR et al., 2015; REIS et al., 2013).

Além disso, a predição da F_a (fração absorvida) em seres humanos pode ser calculada utilizando os resultados de $P_{ef, ratos}$ na Equação 1.5 proposta por Sugano e colaboradores (2001) (ESCRIBANO et al., 2012; SUGANO et al., 2001a).

$$F_a = 1 - \exp(-38450 \cdot P_{ef, ratos})$$

Equação 1.5

onde: $P_{ef, ratos}$ é a permeabilidade efetiva obtida a partir de estudos de perfusão *in situ* em ratos (DEZANI et al., 2016).

Conforme mencionado anteriormente, os estudos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico permitem obter a P_{ap} , uma vez que o fármaco pode ser quantificado no sangue após os processos de transporte que ocorre no segmento intestinal. Neste caso, os resultados de P_{ap} podem ser calculados por meio da Equação 1.6.

$$P_{ap} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_{doadora}}$$

Equação 1.6

onde: Q é a quantidade cumulativa do fármaco que aparece no sangue mesentérico em função do tempo t na condição de equilíbrio; A corresponde à área ($2\pi Rl$) de superfície intestinal disponível para a absorção considerando o comprimento (l) e o raio (R); e $C_{doadora}$ é a concentração do fármaco presente na solução de perfusão.

Uma vez que os estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* permitem obter os valores de P_{ef} e de P_{ap} , as diferenças entre estes dois parâmetros não são esclarecidas na literatura. De maneira resumida, a P_{ef} é obtida a partir da comparação entre as concentrações do fármaco no local de entrada (porção proximal) e no local de saída (porção distal) do intestino canulado. Por outro lado, a P_{ap} está diretamente relacionada à concentração real do fármaco no sangue mesentérico que foi capaz de superar mecanismos que limitam a biodisponibilidade, tais como o transporte de efluxo e o metabolismo intestinal (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

Conforme indicado pelo SCBDF, fármacos classe I sofrem pouca ou nenhuma influência de transportadores presentes nos enterócitos. Por outro lado, fármacos classe III e IV podem apresentar diferenças entre os valores obtidos de P_{ef} e entre os valores obtidos de P_{ap} . Em outras palavras, os resultados de P_{ef} podem não corresponder às mesmas conclusões obtidas por meio dos resultados de P_{ap} . Essa observação pode sugerir o envolvimento de diferentes mecanismos de transporte nos processos absorptivos, os quais muitas vezes não fica claro quando a permeabilidade é baseada somente na avaliação da P_{ef} (CUMMINS et al., 2003; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Embora fármacos SCBDF classe I não sofram influência de transportadores, é de suma importância destacar que, em alguns casos, a administração simultânea de diferentes medicamentos que contêm fármacos variados pode favorecer a ocorrência de competições por transportadores e/ou por enzimas metabolizadoras, o que resulta em efeitos imprevisíveis na cinética de absorção das substâncias

envolvidas, principalmente nos casos de farmacoterapia crônica (HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Portanto, a P_{ef} não permite identificar com clareza os fatores interferentes da permeabilidade através da parede do TGI, uma vez que este parâmetro é baseado no princípio de que o desaparecimento do fármaco do lúmen intestinal é atribuído somente à permeabilidade. Por outro lado, a P_{ap} representa com maior precisão a predição de absorção *in vivo*, uma vez que essa medida é baseada no aparecimento do fármaco no sangue mesentérico e está relacionada à superação dos fatores limitantes da absorção oral (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

Via oral de administração de fármacos

Para fármacos administrados oralmente, as características de solubilidade e de permeabilidade constituem importantes fatores para os processos de absorção (AMIDON et al., 1995; CUSTODIO; WU; BENET, 2008).

O principal sítio de absorção no TGI está localizado no intestino delgado, especialmente no duodeno e na porção proximal do jejuno. Cerca de 90% dos processos absorptivos de fármacos ocorrem no intestino delgado, uma vez que, morfológicamente, esta porção apresenta vilosidades e microvilosidades que aumentam a área de superfície disponível para a absorção (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DESESSO; JACOBSON, 2001).

No TGI, diversos valores de pH podem ser encontrados em diferentes porções devido aos processos de digestão. As variações nos valores de pH entre a condição de jejum e o estado alimentado são apresentadas na Quadro 1.5. Assim, a absorção de fármacos através do TGI é, em parte, condicionada pelo pH (ASHFORD, 2002; AVDEEF, 2003).

Quadro 1.5: Valores de pH em diferentes porções do TGI sob condição de jejum e no estado alimentado (ASHFORD, 2002; AVDEEF, 2003).

Região do TGI	Valores de pH	
	Jejum	Estado alimentado
Estômago	1,0-2,0	2,0-5,0
Duodeno	4,0-5,4	4,9-5,9
Jejuno	4,4-6,5	5,2-6,0
Íleo	6,8-8,0	6,8-7,8
Cólon	5.5-7.0	6.5-8.0

Os enterócitos são as células especializadas na absorção de nutrientes e substâncias através do TGI e apresentam-se polarizadas, ou seja, o lado apical está voltado para o lúmen intestinal, enquanto que o lado basolateral está voltado para os vasos sanguíneos, conforme demonstrado na Figura 1.3. Os enterócitos são unidos por junções intercelulares, as quais apresentam um espaço denominado paracelular por onde pequenas moléculas de características hidrofílicas podem atravessar para o lado basolateral (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; AVDEEF, 2003; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Figura 1.3: Representação esquemática da monocamada de enterócitos, lados apical e basolateral, junções intercelulares, microvilosidades e principais mecanismos de transporte envolvidos nos processos de absorção de fármacos: (A) transporte passivo paracelular; (B) transporte passivo transcelular; (C) transporte ativo mediado por transportador de efluxo; (D) transporte ativo transcelular mediado por transportador de influxo e (E) transporte por endocitose (adaptado de (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000)).

A absorção de um fármaco é um processo dinâmico e complexo e pode ocorrer por meio de um ou mais mecanismos de transporte através da parede do TGI. Conforme demonstrado na Figura 1.3, as principais vias são: transporte passivo paracelular; transporte passivo transcelular; transporte ativo mediado por transportador de efluxo; transporte ativo transcelular mediado por transportador de influxo e transporte por endocitose (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEL AMO; HEIKKINEN; MÖNKKÖNEN, 2009; SHAHBAZI; SANTOS, 2013).

Para o transporte ativo, dois tipos de carreadores estão presentes ao longo do TGI: transportadores de efluxo e de influxo. Tais proteínas podem ser encontradas tanto no lado apical quanto no lado basolateral dos enterócitos. Os carreadores de influxo são responsáveis pelo transporte do fármaco do lúmen intestinal para o lado basolateral, enquanto que os carreadores de efluxo possuem ação secretória, ou seja, transportam o fármaco do lado basolateral de volta para o lúmen, limitando sua absorção oral (JUNIOR et al., 2015).

Dentre os diferentes tipos de transportadores de efluxo, a glicoproteína-P (P-gp) têm recebido grande atenção nos estudos de transporte secretório, uma vez que este carreador pode ser responsável pela baixa biodisponibilidade de diferentes fármacos. A P-gp está localizada na porção apical dos enterócitos (JUNIOR et al., 2015).

Além dos mecanismos de efluxo, a presença de enzimas nos enterócitos também constitui uma barreira limitante à absorção de fármacos. A subfamília CYP3A é expressa em níveis significativos nos enterócitos, especialmente as isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5. Estas, por sua vez, contribuem para a ocorrência do metabolismo pré-sistêmico, o qual pode afetar a biodisponibilidade oral de fármacos que são substratos de tais enzimas (KIVISTO et al., 1996; WACHER; SALPHATI; BENET, 2001; WON; OBERLIES; PAINE, 2012).

Recentemente, muitos estudos sugerem que tanto a P-gp quanto a enzima CYP3A agem de maneira coordenada para formar uma barreira eficiente contra a absorção de xenobióticos, possíveis patógenos e outras substâncias prejudiciais ao organismo. Esta interação P-gp-CYP3A constitui um importante processo de desintoxicação. Sem a ação de um transportador de efluxo, a concentração intracelular da substância prejudicial poderia causar a saturação das enzimas presentes nos enterócitos, resultando em metabolismo parcial e, como consequência, possibilitando a passagem excessiva do xenobiótico para a corrente sanguínea. Ao contrário, o carreador de efluxo realiza o transporte da substância prejudicial de volta para o lúmen intestinal, prevenindo a saturação enzimática. O resultado desta ação coordenada entre carreador efluxo e enzimas resulta na diminuição da biodisponibilidade e, conseqüentemente, redução da eficácia terapêutica (BORCHARDT; SMITH; WILSON, 1996; GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; TANG et al., 2013; VAN HERWAARDEN; VAN WATERSCHOOT; SCHINKEL, 2009; VAN WATERSCHOOT; SCHINKEL, 2011; VON RICHTER et al., 2004).

Para os estudos por meio do modelo de perfusão *in situ*, o uso de animais geneticamente modificados (*knockout*) permite investigar a interação entre o fármaco e os transportadores específicos, o que possibilita prever os impactos nos processos de absorção oral, além de responder possíveis dúvidas que não são resolvidas por meio dos modelos *in vitro* e/ou *ex vivo*. Além disso, a comparação entre animais da linhagem selvagem e os geneticamente modificados permite

avaliar os parâmetros farmacocinéticos envolvidos (STAPPAERTS et al., 2015; TANG et al., 2013). A Quadro 1.6 apresenta resumidamente os transportadores de influxo e de efluxo, suas localizações nos enterócitos, principais substratos e os animais *knockout* empregados.

Embora a utilização de animais geneticamente modificados possa representar um baixo rendimento para o desenvolvimento farmacêutico, a precisão dos resultados para a predição de absorção em seres humanos é valiosa uma vez que o método de perfusão *in situ* é considerado o modelo mais próximo das condições *in vivo*, especialmente para os fármacos que apresentam alguma interação significativa com transportadores ou enzimas (STAPPAERTS et al., 2015).

Quadro 1.6: Principais carreadores de influxo e de efluxo considerados nos estudos de transporte de fármacos, suas localizações no enterócito, principais substratos e animais geneticamente modificados (*knockout*).

Carreador/Transportador	Tipo	Localização no enterócito	Principais substratos	Animal <i>Knockout</i>	Referências
Transportador equilibrador de nucleosídeo 1 (ENT1; Slc29a1)	Influxo/efluxo	Basolateral	Nucleosídeos endógenos, ribavirina	Ent 1 ^{-/-}	1
Transportador de cátions orgânicos 1 (OCT1; Slc22a1)	Influxo/efluxo	Basolateral	Cátions orgânicos, metformina, aciclovir, zalcitabina, ranitidina	Oct1;Oct2 ^{-/-}	1,2
Transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2; Slc22a2)	Influxo/efluxo	Basolateral	Cátions orgânicos, metformina, aciclovir, zalcitabina, ranitidina	Oct1;Oct2 ^{-/-}	1,2
Transportador de cátions orgânicos 1 (OCTN1; Slc22a4)	Influxo/efluxo	Apical	Cátions orgânicos, zwitterions, quinidina, verapamil	Octn1 ^{-/-}	1,2
Transportador de cátions orgânicos 2 (OCTN2; Slc22a5)	Influxo/efluxo	Apical	Cátions orgânicos, zwitterions, quinidina, verapamil, imatinib, ácido valproico, espironolactona	Octn2 ^{-/-}	1,2
Glicoproteína-P (P-gp; Abcb1a/1b)	Efluxo	Apical	Verapamil, rodamina 123, paclitaxel, digoxina, GG918, saquinavir, suco de toranja, tween 80, PEG-400, vincristina, vinblastina	Mdr1a ^{-/-} ;Mdr1a/1b ^{-/-}	1-4
Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP; Abcg2)	Efluxo	Apical	Zidovudina, lamivudina, prazosina, efavirenz, ciprofloxacino, rifampicina, rosuvastatina, atorvastatina, fluvastatina	Bcrp ^{-/-}	1,2
Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (MRP1; Abcc1)	Efluxo	Basolateral	Vinca alcalóides, etoposide, metotrexato	Mrp1 ^{-/-}	1,2
Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 2 (MRP2; Abcc2)	Efluxo	Apical	Paclitaxel, vinblastina, pravastatina, ampicilina, sulfasalazina, colchicina, darunavir, metotrexato, ezetimiba	Abcc2 ^{-/-}	1-3

(*Continua*)

(Continuação)

Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 3 (MRP3; Abcc3)	Efluxo	Basolateral	Ácidos biliares, metotrexato	Abcc3 ^{-/-}	1,2
Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 4 (MRP4; Abcc4)	Efluxo	Apical/Basolateral	Diuréticos, antibióticos, fármacos antivirais	Abcc4 ^{-/-}	1,2
Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 5 (MRP5; Abcc5)	Efluxo	Basolateral		Abcc5 ^{-/-}	2
Transportador de ânions orgânicos polipeptídios 2B1 (OATP2B1; Slco)	Influxo	Apical	Pravastatina, atorvastatina, fexofenadina, mesalazina,	Oatp ^{-/-}	1,2
Transportador de ânions orgânicos polipeptídios 1A2 (OATP1A2)	Influxo	Apical	Fexofenadina, talinolol, ciprofloxacino	Oatp1a ^{-/-}	2
Proteína transportadora de peptídeos 1 (PEPT1; Slc15a)	Influxo	Apical	Cefalosporinas, enalapril, oseltamivir,	Pept ^{-/-}	2
Proteína transportadora de monocarboxilato 1 (MCT1; Slc16a)	Influxo	Apical	Ácido salicílico, lactato	Slc16a ^{-/-}	2
Transportador de monoamina (PMAT; Slc29)	Influxo	Apical	Serotonina, dopamina, epinefrina, norepinefrina, metformina, histamina	Slc29 ^{-/-}	2

(1) TANG et al., 2013; (2) ESTUDANTE et al., 2013; (3) SEVIN et al., 2013; (4) ADACHI, SUZUKI, SUGIYAMA, 2003;

Estudo de perfusão *in situ* e sua aplicação no SCB e no SCBDF

Uma vez que o SCB foi adotado pela FDA para fins de bioisenção de fármacos classe I, o desenvolvimento de modelos empregados nos estudos de permeabilidade foi intensificado. Embora algumas substâncias sejam classificadas como altamente solúveis e altamente permeáveis, o envolvimento de transportadores de influxo/efluxo não pode ser previsto por este sistema. O emprego de inibidores de carreadores de efluxo ou de enzimas em experimentos indica se determinada substância possui permeabilidade limitada em função destes dois parâmetros.

Alguns fármacos classificados como SCB classe I podem apresentar problemas na biodisponibilidade oral, uma vez que o processo de absorção envolve a participação de transportadores e enzimas. A avaliação *in vitro* do transporte de efluxo que resulta em significativa influência da P-gp sobre a permeabilidade não necessariamente indica o comprometimento da absorção de um fármaco SCBDF classe I. Porém, para substâncias classe III e IV, o SCBDF prevê alterações na biodisponibilidade quando carreadores estão envolvidos. Para a maioria dos fármacos SCBDF classe I, a P-gp exerce pouca ou nenhuma influência nos processos de absorção, o que é clinicamente irrelevante (ESTUDANTE et al., 2013a; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Para fármacos SCBDF classe II, a elevada permeabilidade permite que o transporte através dos enterócitos ocorra de maneira rápida. Porém, a baixa solubilidade favorece a influência dos carreadores de efluxo, uma vez que o fármaco não estará totalmente solubilizado em pouco tempo. Para substâncias SCBDF classe III, o envolvimento de transportadores é muito provável, o que traz efeitos negativos clinicamente. E, por fim, para os fármacos SCBDF classe IV, a solubilidade e a permeabilidade limitarão significativamente o processo de absorção e o efeito de influxo e/ou efluxo é significativo na maioria dos casos, o que resulta em problemas de correlação *in vitro-in vivo* (ESTUDANTE et al., 2013a).

Para fins de classificação biofarmacêutica, marcadores de alta e de baixa permeabilidade devem ser empregados para designar os valores limítrofes para identificar se uma substância é pouco ou altamente permeável (KIM et al., 2006). A escolha de uma substância de alta permeabilidade para ser empregada como

marcador nos estudos de permeabilidade é discutível. Larregieu e Benet (2014) expõem a necessidade de encontrar um novo composto para ser usado como marcador nos estudos de permeabilidade, uma vez que o metoprolol apresenta F_a em torno de 95%, o que pode restringir o intervalo de valores considerado para classificar um fármaco como altamente permeável (CDER/FDA, 2000; CPMP/EMA, 2010; KIM et al., 2006; LARREGIEU; BENET, 2014).

Em um estudo conduzido por Kim e colaboradores, vinte compostos foram avaliados em modelo de perfusão *in situ* para fins de bioisenção de fármacos SCB classe I. Neste caso, o metoprolol foi empregado como marcador de alta permeabilidade e foi coperfundido com outros fármacos. Este estudo permitiu a classificação adequada das substâncias avaliadas, o que indicou que o método empregado foi adequado para a determinação da permeabilidade (KIM et al., 2006)(KIM et al., 2006).

O transporte local-dependente da cimetidina e da famotidina (SCB classe III) foi avaliado por meio do modelo de perfusão *in situ* na presença e na ausência de verapamil (inibidor de P-gp) em diferentes porções do intestino delgado de ratos. Ambos os fármacos apresentaram transporte local-dependente e a coperfusão com verapamil mostrou que a quantidade permeada aumentou nas porções distais do intestino, o que indicou que a P-gp causou interferências nos processos de absorção (BENET, 2009; DAHAN; AMIDON, 2009b).

A classificação dos fármacos de acordo com o SCB e o SCBDF é amplamente discutida na literatura e alguns estudos sobre o modelo de perfusão *in situ* têm sido utilizados para a classificação biofarmacêutica. No entanto, algumas substâncias que apresentam grande interação com transportadores e/ou enzimas intestinais tendem a exibir resultados inesperados em estudos *in vitro*, especialmente quando a permeabilidade é avaliada por método simples como o PAMPA (membrana artificial paralela), a qual não expressa transportadores ou enzimas de qualquer tipo. Para o SCBDF, a classificação de um fármaco é mais complexa, pois este sistema considera outros parâmetros não considerados pelo SCB.

CONCLUSÃO

O modelo de perfusão *in situ* é amplamente utilizado em estudos para avaliar a permeabilidade de fármacos oralmente administrados. Além disso, este método tem sido empregado em ensaios de transporte para avaliar a influência de carreadores e enzimas presentes nos enterócitos (CUMMINS et al., 2003). A grande vantagem metodológica do modelo de perfusão *in situ* é a possibilidade de avaliar a permeabilidade local-dependente, a qual pode ser extremamente útil para estudos com fármacos com características físico-químicas específicas (absorção pH-dependente, por exemplo).

Embora o modelo de perfusão *in situ* seja considerado o mais próximo da condição *in vivo*, essa técnica é laboriosa. Por outro lado, os dados obtidos a partir deste modelo permitem responder as dúvidas sobre o comportamento *in vivo* do fármaco muitas vezes não esclarecidas por outros modelos. Além disso, a avaliação da influência de excipientes, transportadores e enzimas no TGI pode auxiliar no desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficientes, visando a baixa toxicidade, a elevada eficácia e a segurança no uso terapêutico de medicamentos (SONG et al., 2014).

Os estudos de perfusão *in situ* em roedores fornecem dados mais precisos sobre os fármacos em comparação com os ensaios conduzidos em modelos *in vitro*, uma vez que a perfusão é considerada adequada para investigar a farmacocinética, a interação fármaco-fármaco, a interação P-gp-CYP e o transporte de efluxo.

O modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico apresenta-se como uma técnica promissora, a qual deve ser empregada nos estudos de permeabilidade e transporte de maneira racional, uma vez que este experimento é laborioso e delicado do ponto de vista ético. Além disso, os resultados de P_{ap} possuem elevado poder preditivo e permite identificar o possível envolvimento de carreadores e/ou enzimas nos processos de permeabilidade de fármacos.

Desta forma, quando há dúvidas em relação à classificação biofarmacêutica, diferenças estatísticas podem ser observadas entre os valores de P_{ap} e não percebidas quando há comparação entre os valores de P_{ef} . Assim, as confusões relacionadas aos mecanismos de transporte e à classificação biofarmacêutica de compostos podem ser resolvidas por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. E. et al. Predicted absorption rates with simultaneous bulk fluid flow in the intestinal tract. **Journal of Theoretical Biology**, v. 89, n. 2, p. 195–210, 1981.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANNAERT, P. et al. In vitro, ex vivo, and in situ intestinal absorption characteristics of the antiviral ester prodrug adefovir dipivoxil. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 8, p. 1054–1062, 2000.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 280–289, 2012.

ASHFORD, M. The gastrointestinal tract - Physiology and drug absorption. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2nd. ed. London: Churchill Livingstone, 2002. p. 217–233.

AVDEEF, A. **Absorption and Drug Development: solubility, permeability and charge state**. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BENET, L. Z. The drug transporter-metabolism alliance: Uncovering and defining the interplay. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 6, p. 1631–1643, 2009.

BERGGREN, S. et al. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 553–560, 2004.

BERLIOZ, F. et al. Neural modulation of cephalexin intestinal absorption through the di- and tripeptide brush border transporter of rat jejunum in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 3, p. 1037–1044, 1999.

BORCHARDT, RONALD T.; SMITH, P. L.; WILSON, G. **Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism**. New York: Springer, 1996. v. 8

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

CAI, Y. et al. Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 70, n. 2, p. 175–81, 2014.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. FDA Approved Drug Products. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=DIDANOSINE>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

CHIOU, W. L.; BARVE, A. Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats. **Pharmaceutical Research**, 1998.

CHIOU, W. L.; BUEHLER, P. W. Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 868–874, 2002.

CPMP/EMA. Guideline on the investigation of bioequivalence European Medicines Agency. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:GUIDELINE+ON+THE+INVESTIGATION+OF+BIOEQUIVALENCE#0>>.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

CUSTODIO, J. M.; WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 717–733, 2008.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009a.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting. **American Journal of Physiology**. Gastrointestinal and liver physiology, v. 297, n. 2, p. G371–G377, 2009b.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSP/IP) approach in the rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DEL AMO, E. M.; HEIKKINEN, A. T.; MÖNKKÖNEN, J. In vitro-in vivo correlation in p-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2–3, p. 200–211, 2009.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. **Food Chem Toxicol**, v. 39, n. 3, p. 209–228, 2001.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DOLUISIO, J. T. et al. Drug absorption. I. An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 1196–2000, 1969.

ERIKSSON, A. H. et al. The intestinal absorption of a prodrug of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 is mediated by PEPT1: In situ rat intestinal perfusion studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1574–1581, 2010.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

ESTUDANTE, M. et al. Intestinal drug transporters: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1340–56, 2013.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1336–1342, 1996.

FAGERHOLM, U.; LENNERNÄS, H. Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 5, p. 247–253, 1995.

GALETIN, A.; GERTZ, M.; HOUSTON, J. B. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 25, n. 1, p. 28–47, 2010.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 199–219, 1997.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JAIN, R.; JADON, N.; RADHAPYARI, K. Cathodic adsorptive stripping voltammetric studies on lamivudine: An antiretroviral drug. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, n. 1, p. 254–260, 2007.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KATO, Y. et al. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. **Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals**, v. 36, n. 6, p. 1088–1096, 2008.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

KIVISTO, K. T. et al. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. **Br journal of Clinical Pharmacologicalournal of Clinical Pharmacological**, v. 42, p. 387–389, 1996.

KOLJONEN, M. et al. Transport evaluation of salicylic acid and structurally related compounds across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 531–538, 2008.

KOMIYA, I. et al. Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 4, p. 249–262, 1980.

LANE, M. E.; LEVIS, K. A.; CORRIGAN, O. I. Effect of intestinal fluid flux on ibuprofen absorption in the rat intestine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 60–66, 2006.

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1335–44, 2014.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LI, M. et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 37–45, 2011.

LOZOYA-AGULLO, I. et al. In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: Investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, n. 1–2, p. 1–7, 2015.

MAHER, S. et al. Evaluation of intestinal absorption and mucosal toxicity using two promoters. II. Rat instillation and perfusion studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 301–311, 2009.

MASAOKA, Y. et al. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 240–250, 2006.

MORISHITA, M. et al. A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 118, n. 2, p. 177–184, 2007.

PENG, Y. et al. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 1, p. 120–130, 2014.

RATHORE, R. et al. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 374–380, 2008.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

REIS, J. M.; SINKÓ, B.; SERRA, C. H. R. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) - Is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1071–1076, 2010.

SCHANKER, L. S. et al. Absorption of drugs from the rat small intestine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 123, n. 1, p. 81–88, 1958.

SCHURGERS, N. et al. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anesthetized rat in situ. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 2, p. 117–119, 1986.

SCHURGERS, N.; DE BLAEY, C. J. Effect of pH, buffer concentration and buffer composition on the absorption of theophylline from the small intestine of the rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 19, n. 3, p. 283–295, 1984.

SEVIN, E. et al. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 3, p. 334–9, 2013.

SHAHBAZI, M.-A.; SANTOS, H. A. Improving oral absorption via drug-loaded nanocarriers: absorption mechanisms, intestinal models and rational fabrication. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 28–56, 2013.

SONG, W. H. et al. In situ intestinal permeability and in vivo oral bioavailability of celecoxib in supersaturating self-emulsifying drug delivery system. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 5, p. 626–635, 2014.

STAPPAERTS, J. et al. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: Challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 665–681, 2015.

SUGANO, K. et al. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 181–188, 2001.

SUTTON, S. C.; RINALDI, M. T.; VUKOVINSKY, K. E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and ¹⁴C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 3, p. E25, 2001.

TANG, S. C. et al. Genetically modified mouse models for oral drug absorption and disposition. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 853–8, 2013.

THOMSON, A. B. R. et al. Intestinal uptake of fatty acids and cholesterol in four animals species and man: Role of unstirred water layer and bile salt micelle. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, v. 75, n. 2, p. 221–232, 1983.

TSUJI, A. et al. GI absorption of β -lactam antibiotics II: Deviation from pH-partition hypothesis in penicillin absorption through *In situ* and *In vitro* lipoidal barriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 12, p. 1705–1711, 1978.

VAN HERWAARDEN, A. E.; VAN WATERSCHOOT, R. A. B.; SCHINKEL, A. H. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 5, p. 223–227, 2009.

VAN REES, H.; DE WOLFF, F. A.; NOACH, E. L. The influence of diphenylhydantoin on intestinal glucose absorption in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 310–315, 1974.

VAN WATERSCHOOT, R. A. B.; SCHINKEL, A. H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 390–410, 2011.

VOLPE, D. A. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: **Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. N: Springer, 2008. v. VIIp. 665–680.

VOLPE, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 670–678, 2010.

VON RICHTER, O. et al. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis in paired tissue specimens. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 75, n. 3, p. 172–183, 2004.

WACHER, V. J.; SALPHATI, L.; BENET, L. Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 89–102, 2001.

WON, C. S.; OBERLIES, N. H.; PAINE, M. F. Mechanisms underlying food - drug interactions: Inhibition of intestinal metabolism and transport. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 186–201, 2012.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 102–106, 2009.

1.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MECANISMO DE EFLUXO PELA P-GP NOS ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL²

---

² O material apresentado neste capítulo foi baseado na publicação do artigo:

JUNIOR, J.B.S.; DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; SERRA, C.H.R. Evaluating potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permeability model for assessing gastrointestinal drug absorption. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 15, p.858-871, 2015.

RESUMO

Para o sucesso de um tratamento terapêutico, o fármaco administrado por via oral depende de vários fatores que afetam sua biodisponibilidade, eficácia e segurança clínica. Em diversos tipos de células humanas, inclusive enterócitos, carreadores de efluxo como a glicoproteína-P (P-gp), a BCRP e a MRP2 estão envolvidos na secreção de algumas substâncias, o que deve ser investigado para permitir a compreensão sobre os problemas de absorção oral e biodisponibilidade. Diferentes metodologias usadas para avaliar e prever a absorção *in vivo* são conhecidas atualmente e a escolha de um método adequado para avaliar se determinado fármaco é substrato, inibidor ou indutor de P-gp deve ser feita de maneira cuidadosa. Assim, o presente trabalho de revisão teve como objetivo apresentar a principal proteína carreadora (P-gp) e discorrer sobre suas funções na etapa de absorção de fármacos administrados oralmente. Além disso, este trabalho também apresenta os principais métodos empregados nos ensaios de permeabilidade e transporte para avaliar o efeito de efluxo causado por este transportador. Alguns estudos relatam que a P-gp é uma proteína dinâmica que atua realizando a secreção de substâncias exógenas e endógenas, como a aldosterona e o cortisol. Além disso, este carreador atua protegendo o organismo contra a entrada de xenobióticos. Vários métodos empregados para os estudos de permeabilidade podem também ser utilizados nos experimentos de transporte de efluxo por meio da comparação entre ensaios conduzidos na ausência e na presença de inibidor de P-gp. As células MDCK transfectadas com o gene MDR1 apresentam uma superexpressão desta proteína transportadora. Deste modo, a utilização de células MDCK-MDR1 representa o modelo de primeira escolha para analisar se determinada substância é ou não substrato de P-gp. Estudos bidirecionais em células Caco-2 também podem ser realizados para avaliar o efeito de efluxo, embora a expressão de carreadores neste modelo seja variável. Modelos *ex vivo* e de perfusão *in situ* também permitem analisar o impacto clínico do mecanismo de efluxo nos processos absorptivos. Assim, mediante a possibilidade de utilizar diferentes métodos para avaliar o efluxo de fármacos, é importante destacar que cada modelo possui vantagens e limitações, as quais deverão ser analisadas cautelosamente para permitir a adequada correlação *in vitro* x *in situ* x *in vivo*.

Palavras-chave: Caco-2; permeabilidade; efluxo; *ex vivo*; *in situ*; *in vitro*; MDCK; MDCK-MDR1; glicoproteína-P.

INTRODUÇÃO

A administração oral de medicamentos constitui uma via preferencial em função da sua conveniência, baixo custo, segurança e eficiência. Para o sucesso terapêutico, a adequada absorção oral assegura que o fármaco esteja presente em seu sítio de ação. A etapa de absorção através da parede do trato gastrointestinal (TGI) é complexa e depende de fatores que interferem na solubilidade e na permeabilidade (ANTUNES et al., 2013; POLLI et al., 2004; PRAKASH et al., 2008; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

Os processos de absorção de fármacos através do TGI ocorrem majoritariamente no intestino delgado, mais especificamente nas regiões do duodeno e jejuno proximal através dos enterócitos. Estas células são responsáveis pela absorção de substâncias, são unidas por junções intracelulares e apresentam-se polarizadas, ou seja, possuem uma região apical e outra basolateral. A natureza lipofílica das membranas dos enterócitos e as junções intercelulares constituem as principais barreiras físicas que limitam a permeação de fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; GRASSI et al., 2007; HILLGREN; KATO; BORCHARDT, 1995; LENNERNÄS, 2007; SALAMA; EDDINGTON; FASANO, 2006).

O transporte de uma substância do lado apical para o basolateral é dinâmico e complexo e pode ocorrer por meio de um dos mecanismos conhecidos ou pela combinação deles. A difusão passiva constitui o mecanismo mais comum e é dividida em duas categorias: transporte passivo transcelular e transporte passivo paracelular. Já o transporte ativo ocorre pela ação de dois tipos de carreadores: de influxo e de efluxo (APPARAJU; NALLANI, 2007; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; BUCKLEY et al., 2012; CAO et al., 2006; GRASSI et al., 2007). A Figura 1.4 representa a monocamada de enterócitos e os principais mecanismos envolvidos no transporte de fármacos.

Figura 1.4: Representação esquemática da monocamada de enterócitos e as principais vias de transporte de fármacos: (1) transporte ativo mediado por carreador de efluxo; (2) transporte passivo paracelular; (3) transporte passivo transcelular; (4) transporte ativo mediado por carreador de influxo e (5) endocitose (adaptado de (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; JUNIOR et al., 2015)).

O transporte passivo transcelular ocorre através dos enterócitos e é baseado na transferência do fármaco do lado luminal para o lado seroso a favor do gradiente de concentração. De uma maneira geral, as moléculas sem carga são elegíveis para serem transportadas por esta via. Além disso, fatores como pK_a do fármaco, lipofilicidade ($\log P$ e $\log D$), área de superfície polar, número de ligações de hidrogênio e tamanho molecular podem interferir no mecanismo de transporte passivo transcelular (APPARAJU; NALLANI, 2007; CAO et al., 2006; GRASSI et al., 2007).

O transporte passivo paracelular ocorre através das junções intercelulares, as quais são mais unidas nas porções distais do intestino delgado. Este mecanismo permite apenas a passagem de moléculas pequenas (peso molecular menor que 250 Da) e hidrofílicas ($\log P < 0$) (ANTUNES et al., 2013; AVDEEF, 2003). Já a permeabilidade mediada por carreadores de influxo ou efluxo ocorre com gasto de

energia (mecanismo ativo) e corresponde a um processo saturável (BUCKLEY et al., 2012).

Os carreadores de influxo atuam transportando o fármaco no sentido absorptivo, ou seja, do lado apical para o lado basolateral. Ao contrário, os carreadores de efluxo transportam o fármaco no sentido secretório, ou seja, de volta para o lúmen. Estes dois mecanismos são dependentes do gasto de energia proveniente de ATP (adenosina trifosfato) e a interação entre a substância a ser transportada e o carreador é mandatória para esse processo ocorrer. Assim, as características estruturais dos fármacos são fatores críticos para que ocorra o reconhecimento da molécula como substrato de determinada proteína.

A glicoproteína-P (P-gp ou ABCB1) é codificada pelo gene MDR1 e constitui o carreador mais estudado até a atualidade. Esta proteína está presente em diferentes tecidos no organismo, tais como: intestino, testículos, rins, placenta e barreira hematoencefálica. A P-gp é responsável por transportar seus substratos de volta para o lúmen intestinal, o que resulta em baixa absorção e biodisponibilidade incompleta de alguns fármacos. Além disso, o referido carreador atua também na secreção de substâncias endógenas, tais como a aldosterona e o cortisol. A expressão de P-gp é maior nas porções distais do intestino delgado, o que deve ser considerado em estudos de transporte e nas etapas de desenvolvimento farmacêutico de formas farmacêuticas de liberação prolongada/modificada. Tais ensaios podem também auxiliar na tomada de decisões e permitir a seleção adequada de moléculas farmacologicamente promissoras (CAO et al., 2006; DAHAN; AMIDON, 2009b; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; JUNIOR et al., 2015; LI et al., 2008; MARTINEZ; AMIDON, 2002; SANKATSING et al., 2004; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006; UNGELL, 2002; VOLPE, 2010).

Além da P-gp, outros carreadores de efluxo também estão presentes no TGI. O BCRP (*breast cancer resistance protein*) e a MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2*) estão localizados na porção apical dos enterócitos e atuam nos processos secretórios de algumas substâncias (AYLIN ARICI et al., 2010; DAHAN; AMIDON, 2009b; ESTUDANTE et al., 2013a; GAO et al., 2014; KIMURA et al., 2007; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SCHINKEL; JONKER, 2012; TANG et al., 2013).

Para os estudos de transporte, os modelos *in vitro*, *in situ* e *ex vivo* podem ser empregados para avaliar se determinada substância apresenta-se como substrato de P-gp. Atualmente, os métodos mais difundidos para os estudos de efluxo incluem: método *in vitro* baseado em culturas celulares, método *ex vivo* com o emprego de segmentos intestinais isolados e método de perfusão *in situ* em animais. A combinação de diferentes modelos é rotineiramente considerada nos estudos de mecanismo de efluxo, uma vez que cada um apresenta vantagens e limitações. Assim, a dificuldade em empregar um único modelo isoladamente pode não permitir a obtenção de resultados conclusivos a respeito da previsão da absorção *in vivo* (BALIMANE; CHONG, 2005; BOHETS et al., 2001; VOLPE, 2010).

Com base no exposto, o presente trabalho de revisão teve como objetivo apresentar a P-gp e suas principais funções em relação aos processos de absorção oral. Além disso, este capítulo discute o emprego de diferentes métodos nos estudos de permeabilidade e transporte para avaliar o mecanismo de efluxo de fármacos. Desta forma, a escolha adequada de um modelo dependerá do conhecimento sobre os diferentes tipos de metodologias empregados nos estudos da previsão da absorção. Além disso, a adequada padronização das condições utilizadas nos experimentos permite também fornecer resultados mais precisos, confiáveis e de maior valor preditivo.

Glicoproteína-P (P-gp)

A glicoproteína-P (P-gp) é o carreador de efluxo mais estudado atualmente e é formada por duas porções proteicas com um sítio para ligação de ATP. Figura 1.5 representa a estrutura da P-gp (CHANG et al., 2013; CHOI; YU, 2014; SCHINKEL; JONKER, 2012).

Figura 1.5: Representação esquemática da estrutura da P-gp presente nos enterócitos. Esta glicoproteína é formada por duas porções proteicas e a primeira volta extracelular é fortemente N-glicosilada (adaptado de (JUNIOR et al., 2015)).

Conforme já mencionado, a P-gp está presente em diferentes tecidos do organismo, os quais são mostrados no Quadro 1.7 (JUNIOR et al., 2015)

Quadro 1.7: Localização e função da P-gp em função do tecido biológico presente no organismo (adaptado de (JUNIOR et al., 2015)).

Tecido	Localização	Função	Ref.
Jejuno, íleo e cólon	Superfície mucosa	Secreta e transporta substâncias de volta para o lúmen intestinal.	[1, 2]
Fígado	Superfície dos canais biliares dos hepatócitos e superfície apical de células que recobrem ductos biliares	Excreção de xenobióticos	[3, 4]
Coração	Células endoteliais de arteríolas e capilares cardíacos	Proteção contra substâncias que podem causar cardiotoxicidade	[5, 6]
Cérebro	Endotélio de capilares	Proteção contra substâncias tóxicas	[3]
Medula óssea	Células-tronco hematopoiéticas	Proteção contra substâncias tóxicas	[7]
Sistema imunológico	Células CD4+, CD8+, T e exterminadoras naturais	Secreção de moléculas citotóxicas	[8]
Rins	Superfície de células epiteliais dos túbulos proximais	Excreção de xenobióticos	[9]
Glândula adrenal	Superfície de células do córtex e medula	Secreção de aldosterona e cortisol	[10, 11]

(1) (HASLAM et al., 2008); (2) (KAGAN et al., 2010); (3) (PORTEOUS et al., 2013); (4) (SANKATSING et al., 2004); (5) (AYLIN ARICI et al., 2010); (6) (BUDDE et al., 2011); (7) (KIM et al., 2011); (8) (ZHANG et al., 2014); (9) (MILLER, 2014); (10) (BELLO-REUSS et al., 2000); (ERNEST; BELLO-REUSS, 1995).

Em relação ao transporte de efluxo pela P-gp, alguns estudos podem ser encontrados na literatura. Experimentos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* foram realizados por Dahan e Amidon (2009) para avaliar a influência da P-gp na absorção da cimetidina e da famotidina. A absorção de ambos os fármacos foi local-dependente, onde os valores de permeabilidade foram menores nas porções distais do TGI (cimetidina: $7,2 \times 10^{-6}$ cm/s no jejuno proximal e $4,1 \times 10^{-6}$ cm/s no íleo distal; famotidina: $3,7 \times 10^{-6}$ cm/s no jejuno proximal e $1,0 \times 10^{-6}$ cm/s no íleo distal). A adição de verapamil como inibidor de P-gp mostrou que não houve diferença significativa nos valores de permeabilidade das substâncias nas regiões proximais, enquanto que o aumento da permeabilidade foi constatado nas porções distais (cimetidina com verapamil: $7,3 \times 10^{-6}$ cm/s no jejuno proximal e $7,4 \times 10^{-6}$ cm/s no íleo distal; famotidina com verapamil: $4,8 \times 10^{-6}$ cm/s no jejuno proximal e $5,2 \times 10^{-6}$ cm/s no íleo distal). Assim, os autores concluíram que a P-gp exerce influência na permeabilidade da cimetidina e da famotidina nas porções distais do intestino delgado, o que destaca a expressão heterogênea deste carreador de efluxo (DAHAN; AMIDON, 2009b; FAIRSTEIN; SWISSA; DAHAN, 2013; JIANG et al., 2014; LENNERNAS, 2014).

Alguns substratos de P-gp são descritos na literatura e incluem a carbamazepina, metoprolol, ranitidina, verapamil e zidovudina, dentre outros (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011; SCHINKEL; JONKER, 2012; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

A ação da P-gp pode ser estimulada por meio do uso de várias substâncias, tais como: midazolam, rifampicina, verapamil e carbamazepina, por exemplo (TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Em alguns casos, o mesmo fármaco pode induzir simultaneamente a P-gp e a enzima CYP3A. Esse processo é capaz de interferir consideravelmente na farmacocinética de medicamentos administrados oralmente. A rifampicina, por exemplo, atua como indutor de P-gp e reduz a biodisponibilidade da digoxina (substrato de P-gp) quando ambos são concomitantemente administrados (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; OGA; YASAKA; JEN, 2003).

Inibidores de P-gp

Em tratamentos com antineoplásicos e antirretrovirais, a inibição eficiente da P-gp pode auxiliar no aumento da biodisponibilidade de fármacos substratos. Em pacientes com neoplasias, o aparecimento de células tumorais que apresentam resistência a múltiplos fármacos apresenta carreadores de efluxo que limitam a entrada de substâncias no tecido doente, o que dificulta o tratamento (ABRAHAM; SALAMA; AZAB, 2015; DE SOUZA et al., 2009; JI; LI; HE, 2009; MATSSON et al., 2009; ODA et al., 2014; SANKATSING et al., 2004).

Em geral, os inibidores de P-gp apresentam elevada lipofilicidade e modulam a função deste carreador por competir com o mesmo sítio de ligação do substrato. Alguns exemplos de inibidores são: colesterol, cortisol, elacridar, cetoconazol, metoprolol, midazolam, progesterona, ranitidina e verapamil (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; SANKATSING et al., 2004; SCHINKEL; JONKER, 2012; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Um fator de extrema importância em relação ao mecanismo de efluxo é a especificidade. Algumas substâncias podem inibir diferentes carreadores de efluxo simultaneamente. Em estudo conduzido por Matsson e colaboradores (2009), 122 substâncias foram avaliadas para determinar a inibição dos três principais transportadores de efluxo (P-gp, MRP2 e BCRP). Os autores observaram que o haloperidol, prednisona, tetraciclina e a vinblastina apresentaram-se como inibidores específicos da P-gp (AYLIN ARICI et al., 2010; BANSAL et al., 2009; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; JI; LI; HE, 2009; MATSSON et al., 2009; SABABI; BORGÅ; HULTKVIST-BENGTSSON, 2001).

Em outro estudo conduzido por Ji, Li e He (2009), a modulação da P-gp foi avaliada com verapamil e CJX2 (derivado do anlodipino). Foi constatado que ambas as substâncias interagiram simultaneamente com a glicoproteína, porém em sítios de ligação diferentes (JI; LI; HE, 2009).

Outro aspecto a ser considerado é a atividade da P-gp em função do polimorfismo genético. A expressão variada do gene MDR1 na população pode estar relacionada às diferenças interindividuais, o que pode afetar o tratamento farmacológico em alguns casos (AZEREDO; COSTA; UCHOA, 2009; ISHIKAWA et al., 2010; SANKATSING et al., 2004).

A concentração do inibidor nos ensaios de transporte de efluxo também é um fator a ser considerado. O verapamil pode atuar tanto como substrato quanto como inibidor, dependendo da sua concentração empregada nos experimentos (SHAHBAZI; SANTOS, 2013; TAKANO; YUMOTO; MURAKAMI, 2006).

Assim, o transporte de um fármaco pode ser aumentado em função da dose administrada, uma vez que o transporte de efluxo é saturável. O aumento da biodisponibilidade pode também ser alcançada com a administração de dois fármacos, onde um deles atua inibindo a P-gp enquanto o outro tem sua permeabilidade favorecida (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; AUNGST, 1999).

Métodos para a avaliar a influência de P-gp na permeabilidade

Diferentes métodos empregados na avaliação do transporte de efluxo incluem: modelo *in vitro* baseado em sistemas celulares (Caco-2 e MDCK), modelos *ex vivo* que empregam segmentos intestinais isolados, modelos de perfusão *in situ* em animais e modelos *in vivo* que envolvem estudos farmacocinéticos. O Quadro 1.8 apresenta os métodos mais empregados nos estudos de transporte de efluxo.

Quadro 1.8: Principais modelos empregados nos estudos de efluxo, suas vantagens e limitações (adaptado de (JUNIOR et al., 2015)).

Método	Vantagens	Limitações	Ref.
Células Caco-2	Expressão de carreadores de influxo e efluxo, origem humana.	Ausência de camada de muco, baixa expressão de enzimas, camada de água estacionária espessa, tempo longo de cultivo, risco de contaminação.	[1, 2]
Ex-vivo (segmentos intestinais isolados)	Utilização de porções intestinais e boa correlação com modelos <i>in vivo</i> .	Viabilidade, camada de água estacionária espessa e intensa manipulação do intestino.	[3, 4]
Perfusão intestinal <i>in situ</i>	próximo das condições <i>in vivo</i> , suprimento de sangue e inervação intactos, transportadores e enzimas ativos.	Anestesia e procedimentos cirúrgicos, método laborioso e demorado.	[1, 5, 6]

(1) (ANTUNES et al., 2013); (2) (SILVA et al., 2011); (3) (DEZANI et al., 2013); (4) (REIS et al., 2013); (5) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000); (6) (LI et al., 2014) (LI et al., 2014).

Métodos *in vitro*

A utilização de métodos *in vitro* é conveniente, pois apresenta baixo custo em comparação com estudos realizados *in vivo*. A ausência de fatores fisiológicos constitui a grande desvantagem do uso de modelos *in vitro*. Diferentes linhagens celulares possuem a capacidade de mimetizar o epitélio intestinal humano e, por esse motivo, são empregadas nos estudos de transporte (ANTUNES et al., 2013; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; EHRHARDT; KIM, 2008).

MDCK e MDCK-MDR1

As células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) são provenientes de rim canino e, quando cultivadas adequadamente, diferenciam-se em células epiteliais. Esta linhagem apresenta espaços paracelulares de forma variável, o que pode estar relacionado às diferenças observadas em resultados de permeabilidade reportados na literatura. No entanto, uma boa correlação entre este modelo e os modelos *in vivo* é descrita na literatura, especialmente para fármacos transportados passivamente (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Um estudo comparativo entre células Caco-2 e MDCK foi realizado com 14 fármacos e uma boa correlação foi obtida entre os dois tipos celulares ($r^2=0,86$) (BRAUN et al., 2000). Em outro estudo conduzido por Irvine e colaboradores (1999), uma boa correlação também foi obtida ($r^2=0,79$) entre Caco-2 e MDCK para 55 fármacos (IRVINE et al., 1999).

O tempo de cultivo para células MDCK é curto (3 a 5 dias), o que é uma grande vantagem em relação ao cultivo de células Caco-2. Por outro lado, a expressão irregular de transportadores e enzimas não permite que esse modelo seja empregado para avaliar fármacos ativamente transportados (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Embora o modelo MDCK apresente baixa capacidade preditiva, estas células são amplamente utilizadas para avaliar o transporte passivo de substâncias em etapas iniciais do desenvolvimento farmacêutico devido à sua origem biológica. Além disso, os experimentos são conduzidos de maneira rápida, além de envolverem menores custos e representarem poucos riscos de contaminação em comparação com Caco-2 (NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Células MDCK transfectadas com gene MDR1 são capazes de superexpressar a P-gp no lado apical das monocamadas. Este modelo é amplamente empregado nos estudos de efluxo e na identificação de fármacos substratos de P-gp. Geralmente, os estudos de transporte realizados em MDCK-MDR1 são bidirecionais, ou seja, o transporte é avaliado na direção apical-basolateral ($A \rightarrow B$) e basolateral-apical ($B \rightarrow A$). A comparação da razão $B \rightarrow A/A \rightarrow B$ possibilita identificar se uma substância é substrato para a P-gp ou não (DE SOUZA

et al., 2009; GARTZKE; FRICKER, 2014; GIACOMINI et al., 2010; LI; WANG; HIDALGO, 2013).

Em um estudo bidirecional conduzido por Souza e colaboradores (2009), a lamivudina e a zidovudina foram avaliados em culturas celulares MDCK, MDCK-MDR1 e Caco-2. A comparação dos resultados obtidos demonstrou que ambos os fármacos são fracos substratos da P-gp em função do elevado valor da razão $B \rightarrow A/A \rightarrow B$ (DE SOUZA et al., 2009).

Caco-2

As células Caco-2 foram utilizadas pela primeira vez em 1989 para estudar a absorção de fármacos oralmente administrados. Esta linhagem se diferencia em células epiteliais e formam uma monocamada celular polarizada com microvilosidades e expressão de transportadores e enzimas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BANSAL et al., 2009; DAHAN; AMIDON, 2009b; DE SOUZA et al., 2009; REIS et al., 2013; SILVA et al., 2011).

O protocolo experimental mais comum para o emprego de células Caco-2 nos estudos de efluxo inclui o ensaio bidirecional, conforme mencionado para MDCK-MDR1. Alguns fatores que interferem nos resultados obtidos em Caco-2 incluem: idade celular, tempo de cultivo, expressão irregular de transportadores e enzimas (DE SOUZA et al., 2009; LAM; RAJARAMAN, 2012; ZHAO et al., 2013).

Uma vez que a expressão de P-gp em células Caco-2 é variável, alguns autores consideram que, mesmo assim, os ensaios conduzidos neste modelo *in vitro* permite obter resultados de acordo com a situação *in vivo* em seres humanos. Por outro lado, outros pesquisadores afirmam que as diferenças na expressão de P-gp com a situação *in vivo* pode resultar na subestimação na identificação de potenciais substratos (ANTUNES et al., 2013; BERGGREN et al., 2004; GOTOH; KAMADA; MOMOSE, 2005).

É possível encontrar na literatura alguns estudos de efluxo em células Caco-2 com o objetivo de identificar substâncias fitoquímicas como substratos da P-gp (CHOI, KIM, 2014). Em estudo conduzido por Oga e colaboradores (2012), o ensaio bidirecional em Caco-2 foi realizado com a finalidade de avaliar a digoxina como substrato de P-gp (OGA et al., 2012).

Métodos *ex-vivo*

Os métodos *ex vivo* incluem o uso de segmentos intestinais isolados provenientes de animais, geralmente ratos. Em câmaras de difusão, a porção do intestino selecionada para o estudo é posicionada entre dois compartimentos (doador e receptor). Em seguida, a solução tampão contendo o fármaco é adicionada no compartimento doador e as amostras são coletadas a partir do compartimento receptor em intervalos regulares de tempo (DEZANI et al., 2013; VOLPE, 2010). Este modelo permite avaliar o transporte de fármacos e estabelecer uma correlação entre ratos e seres humanos (FRANCO et al., 2008; PRETORIUS; BOUIC, 2009; TUKKER, 2000; XIANHUA CAO, LAWRENCE X. YU, 2004; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Os estudos *ex vivo* também podem ser conduzidos com a utilização de segmentos intestinais provenientes de ratos geneticamente modificados (*knockout*) para a realização de ensaios comparativos sobre a influência da P-gp na permeabilidade intestinal de fármacos (COLLETT et al., 2005).

Devido ao uso de segmentos intestinais, a correlação com dados *in vivo* de absorção em seres humanos é elevada devido às semelhanças estruturais e fisiológicas entre as duas espécies (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CAO; YU; SUN, 2008; FRANCO et al., 2008; GRASS, 1997; JAIN et al., 2007; LENNERNÄS, 2007; PRETORIUS; BOUIC, 2009; TUKKER, 2000; YAO; CHIOU, 2006; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Em um estudo bidirecional em modelo *ex vivo* conduzido por Dezani e colaboradores (2013), a permeabilidade da lamivudina e da zidovudina em câmaras de difusão vertical tipo Franz foi avaliada. Os ensaios foram realizados para avaliar a influência da P-gp no transporte dos referidos fármacos. Foi constatado que ambos os fármacos não apresentaram interações significativa com a P-gp no segmento intestinal estudado (DEZANI et al., 2013).

Os estudos realizados por meio do modelo de saco invertido também são bastante reportados na literatura para avaliar o mecanismo de efluxo de fármacos. Parsa e colaboradores (2013) estudaram a influência da P-gp sobre a permeabilidade do etoposídeo utilizando o verapamil como inibidor de P-gp.

Alterações nos valores de permeabilidade do etoposídeo foram observados nestes experimentos (PARSA et al., 2013).

Quevedo, Nieto e Briñón (2011) também estudaram a influência da P-gp sobre a permeabilidade da zidovudina com o emprego do modelo de saco invertido (jejuno e íleo) utilizando verapamil como inibidor de P-gp. Foi constatado que a zidovudina sofreu efluxo nas porções distais do intestino delgado empregado (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011).

Métodos de perfusão *in situ*

A perfusão intestinal *in situ* é realizada em modelos animais, normalmente ratos, e é amplamente empregada nos estudos de permeabilidade e transporte de substâncias para prever a absorção *in vivo*.

Neste método, a solução tampão contendo o fármaco solubilizado é perfundida para o interior do segmento intestinal selecionado e as amostras são coletadas em intervalos de tempo predeterminados (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CUMMINS et al., 2003; DAHAN; AMIDON, 2009b; DEZANI et al., 2016, 2017; IIDA; TOMITA; HAYASHI, 2005; REIS et al., 2013).

Nos últimos anos, o modelo de perfusão *in situ* foi adaptado para permitir a coleta de sangue mesentérico durante a execução dos experimentos. Assim, é possível prever a extensão de absorção de um fármaco. Embora a execução destes ensaios seja laboriosa, os resultados obtidos são mais precisos em relação aos processos absorptivos, o que permite avaliar o envolvimento de mecanismos de transporte de fármacos e a influência do metabolismo pré-sistêmico (CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017; GIACOMINI et al., 2010; VOLPE, 2010).

Assim, o modelo de perfusão *in situ* é considerado o mais próximo das condições *in vivo*, uma vez que o animal permanece vivo durante todo o período de experimento. Isto possibilita a avaliação do mecanismo de efluxo pela P-gp quando um inibidor deste carreador é incluído na solução de perfusão, o que permite avaliar a relevância da interação fármaco-transportador na biodisponibilidade oral e se este mecanismo representa uma importância clínica importante (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2017).

CONCLUSÃO

O conhecimento sobre as funções da P-gp possibilita investigar a interferência do mecanismo de efluxo sobre a absorção oral de fármacos. Neste caso, o transporte de efluxo é responsável pela biodisponibilidade incompleta observada para algumas substâncias.

A utilização de inibidores de P-gp em um modelo experimental, seja ele *in vitro*, *ex vivo* ou *in situ*, auxilia na identificação de fármacos substratos desta proteína de efluxo. A escolha do método adequado a ser empregado para os estudos de efluxo deve contemplar não somente a rapidez na aquisição de resultados, mas também as vantagens e as limitações relacionadas a cada modelo. Assim, a combinação de metodologias permite obter conclusões mais precisas a respeito da predição da absorção oral.

Os estudos de efluxo em etapas iniciais do desenvolvimento farmacêutico são importantes para prever a interferência da P-gp não somente com um único fármaco, mas também com uma combinação de substâncias que podem agir como substratos, inibidores ou indutores da glicoproteína. Os modelos *in vitro* fornecem resultados mais rápidos e objetivos em relação ao efluxo de substâncias. Entretanto, os ensaios em modelos mais próximos das condições *in vivo*, tais como modelo *ex vivo* e modelo de perfusão *in situ*, possibilitam avaliar a relevância clínica da interação fármaco-carreador de efluxo.

Com base no exposto, as etapas de desenvolvimento farmacêutico têm como objetivo selecionar moléculas com ação farmacológica promissora que apresentam mecanismo de transporte por difusão passiva, principalmente. No entanto, a identificação de um substrato de P-gp nas etapas iniciais de desenvolvimento auxilia no aprimoramento de formulações e de associações de fármacos. Desta forma, os ensaios realizados em modelos simples como Caco-2 e MDCK-MDR1 podem identificar um substrato de P-gp com resultados obtidos rapidamente. Por outro lado, os estudos em modelo *ex vivo* e *in situ* permitem compreender a importância clínica desse efeito.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; SALAMA, N. N.; AZAB, A. K. The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 1, p. 26–33, 2015.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013.

APPARAJU, S. K. .; NALLANI, S. C. . **Basics of Drug Absorption from a Biopharmaceutical Perspective**. [s.l.] CRC Press, 2007.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 280–289, 2012.

AUNGST, B. J. P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 39, p. 105–116, 1999.

AVDEEF, A. **Absorption and Drug Development**: solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

AYLIN ARICI, M. et al. Interactions between verapamil and digoxin in langendorff-perfused rat hearts: The role of inhibition of P-glycoprotein in the heart. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 5, p. 847–852, 2010.

AZEREDO, F. J.; COSTA, T. D.; UCHOA, F. D. T. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 4, p. 321–326, 2009.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 5, p. 335–343, 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V; HAN, Y.-H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 1, p. E1–E13, 2006.

BANSAL, T. et al. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4–5, p. 580–590, 2009.

BELLO-REUSS, E. et al. Role of multidrug resistance P-glycoprotein in the secretion of aldosterone by human adrenal NCI-H295 cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 6, p. C1256-65, 2000.

BERGGREN, S. et al. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 553–560, 2004.

BOHETS, H. et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 1, n. 5, p. 367–383, 2001.

BRAUN, A. et al. Cell cultures as tools in biopharmacy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. Anais...2000

BUCKLEY, S. T. et al. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 235–250, 2012.

BUDDE, T. et al. Acute Exposure to Doxorubicin Results in Increased Cardiac P-glycoprotein Expression. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 9, p. 3951–3958, 2011.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CAO, X.; YU, L. X.; SUN, D. **Drug absorption principles**. In: Biopharmaceutics Applications in Drug Development. New York: Springer, 2008. p. 75–100.

CHANG, S. Y. et al. Molecular insight into conformational transmission of human P-glycoprotein. **Journal of Chemical Physics**, v. 139, n. 22, p. 225102, 2013.

CHOI, Y. H.; YU, A.-M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 5, p. 793–807, 2014.

COLLETT, A. et al. Comparison of P-glycoprotein-mediated drug-digoxin interactions in Caco-2 with human and rodent intestine: Relevance to in vivo prediction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 386–393, 2005.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting. **American Journal of Physiology**. Gastrointestinal and liver physiology, v. 297, n. 2, p. G371–G377, 2009.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: **Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. [s.l.: s.n.]. p. 182–215.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

EHRHARDT, C.; KIM, K.-J. **In Situ, In Vitro and In Silico Models**. New york: Springer US, 2008.

ERNEST, S.; BELLO-REUSS, E. Expression and function of P-glycoprotein in a mouse kidney cell line. **The American Journal of Physiology**, v. 269, n. 2 Pt 1, p. C323-33, ago. 1995.

ESTUDANTE, M. et al. Intestinal drug transporters: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1340–56, 2013.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1336–1342, 1996.

FAIRSTEIN, M.; SWISSA, R.; DAHAN, A. Regional-Dependent Intestinal Permeability and BCS Classification: Elucidation of pH-Related Complexity in Rats Using Pseudoephedrine. **The AAPS Journal**, v. 15, n. 2, p. 589–597, 2013.

FRANCO, M. et al. Frog intestinal sac as an in vitro method for the assessment of intestinal permeability in humans: Application to carrier transported drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 182–188, 2008.

GAO, X. et al. Expression of P-glycoprotein and CYP3A4 along the porcine oral-gastrointestinal tract: implications on oral mucosal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 5, p. 599–603, 2014.

GARTZKE, D.; FRICKER, G. Establishment of optimized MDCK cell lines for reliable efflux transport studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 4, p. 1298–1304, abr. 2014.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GOTOH, Y.; KAMADA, N.; MOMOSE, D. The advantages of the Ussing chamber in drug absorption studies. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 10, n. 5, p. 517–23, 2005.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 199–219, 1997.

GRASSI, M. et al. **Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach.** [s.l.] CRC Press, 2007.

HASLAM, I. S. et al. Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84). **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 7, p. 850–861, 2008.

HILLGREN, K. M.; KATO, A.; BORCHARDT, R. T. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. **Medicinal Research Reviews**, v. 15, n. 2, p. 83–109, mar. 1995.

IIDA, A.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. Regional Difference in P-glycoprotein Function in Rat Intestine. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 20, n. 2, p. 100–106, 2005.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin – Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 28–33, 1999.

ISHIKAWA, T. et al. Emerging new technologies in Pharmacogenomics: rapid SNP detection, molecular dynamic simulation, and QSAR analysis methods to validate clinically important genetic variants of human ABC Transporter ABCB1 (P-gp/MDR1). **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 69–81, 2010.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JI, B.-S.; LI, M.; HE, L. Effect of CJX2, an amlodipine derivative, combined with verapamil on P-glycoprotein efflux function in vitro. **Drug Development Research**, v. 70, n. 6, p. 445–449, set. 2009.

JIANG, C.-P. et al. Intestinal Absorptive Transport of Genkwanin from Flos genkwa Using a Single-Pass Intestinal Perfusion Rat Model. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 42, n. 2, p. 349–359, jan. 2014.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KAGAN, L. et al. Role of P-glycoprotein in region-specific gastrointestinal absorption of talinolol in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 9, p. 1560–1566, 2010.

KIM, S.-G. et al. Inhibition of P-glycoprotein facilitated glycosaminoglycan accumulation during chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 14, n. 2, p. 199–205, maio 2011.

KIMURA, Y. et al. Cholesterol fill-in model: Mechanism for substrate recognition by ABC proteins. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 5–6, p. 447–452, 2007.

LAM, K. C. L.; RAJARAMAN, G. Assessment of P-glycoprotein substrate and inhibition potential of test compounds in MDR1-transfected MDCK cells. **Current Protocols in Pharmacology**, n. SUPPL.58, p. 7.13.1-7.13.17, set. 2012.

LENNERNAS, H. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 333–341, 2014.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LI, C. et al. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 5, p. 1186–1197, 2008.

LI, H. et al. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1–2, p. 133–138, 2014.

LI, J.; WANG, Y.; HIDALGO, I. J. Kinetic analysis of human and canine P-glycoprotein-mediated drug transport in MDR1-MDCK cell model: Approaches to reduce false-negative substrate classification. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 9, p. 3436–3446, set. 2013.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 620–643, 2002.

MATSSON, P. et al. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1816–1831, 2009.

MILLER, D. Sphingolipid Signaling Reduces Basal P-Glycoprotein Activity in Renal Proximal Tubule. **J Pharmacol Exp Ther**, n. March, p. 459–464, 2014.

NEWBY, D.; FREITAS, A. A.; GHAFOURIAN, T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 751–765, 2015.

ODA, K. et al. In vitro experimental system for evaluating inhibitory effect of investigational drugs on P-glycoprotein-mediated transcellular transport of tacrolimus (FK506). **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 35, n. 3, p. 135–144, abr. 2014.

OGA, E. F. et al. P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: The influence of herbals on digoxin transport. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 612–617, ago. 2012.

OGA, S.; YASAKA, W. J.; JEN, L. H. The importance of P-glycoprotein (P-gp) and organic anion-transporting polypeptides (OATP) in drug interactions. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 3, p. 121–130, 2003.

PARSA, A. et al. Enhanced permeability of etoposide across everted sacs of rat small intestine by vitamin E-TPGS. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. SUPPL., p. 35–44, 2013.

POLLI, J. E. et al. Summary workshop report: Biopharmaceutics classification system - Implementation challenges and extension opportunities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 6, p. 1375–1381, 2004.

PORTEOUS, C. M. et al. P-glycoprotein (Mdr1a/1b) and breast cancer resistance protein (Bcrp) decrease the uptake of hydrophobic alkyl triphenylphosphonium cations by the brain. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3458–3465, 2013.

PRAKASH, K. et al. Solubility and Dissolution Rate Determination of Different Antiretroviral Drugs in Different pH Media Using UV Visible Spectrophotometer. **E-Journal of Chemistry**, v. 5, n. s2, p. 1159–1164, 2008.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 270–275, 2009.

QUEVEDO, M. A.; NIETO, L. E.; BRIÑÓN, M. C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 151–159, 2011.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SABABI, M.; BORGÅ, O.; HULTKVIST-BENGTSSON, U. The role of P-glycoprotein in limiting intestinal regional absorption of digoxin in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 21–27, 2001.

SALAMA, N. N.; EDDINGTON, N. D.; FASANO, A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 1, p. 15–28, 2006.

SANKATSING, S. U. C. et al. P glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1073–1081, 2004.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 138–153, 2012.

SHAHBAZI, M.-A.; SANTOS, H. A. Improving oral absorption via drug-loaded nanocarriers: absorption mechanisms, intestinal models and rational fabrication. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 28–56, 2013.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 5th Editio ed. New York: MacGraw-Hill, 2005.

SILVA, R. et al. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 4, p. 315–326, 2011.

TAKANO, M.; YUMOTO, R.; MURAKAMI, T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 1–2, p. 137–161, 2006.

TANG, S. C. et al. Genetically modified mouse models for oral drug absorption and disposition. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 853–8, 2013.

TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. In: DRESSMAN, J. B.; LENNERNÄS, H. (Eds.). **Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment**. New York: Marcel Dekker, inc, 2000. p. 51–72.

UNGELL, A.-L. **Cell Culture Models of Biological Barriers: In vitro Test Systems for Drug Absorption and delivery**. London: Taylor and Francis, 2002.

VOLPE, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 670–678, 2010.

XIANHUA CAO, LAWRENCE X. YU, D. S. **Drug Absorption Principles**. [s.l.: s.n.].

YAO, H. M.; CHIOU, W. L. The complexity of intestinal absorption and exsorption of digoxin in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, n. 1–2, p. 79–86, 2006.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

ZHANG, J.-C. et al. Expression levels of P-glycoprotein in peripheral blood CD8+ T lymphocytes from HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 2, p. 431–440, 2014.

ZHAO, G. et al. Enhanced intestinal absorption of etoposide by self-microemulsifying drug delivery systems: Roles of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A inhibition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3–4, p. 429–439, 2013.

1.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO PELA CYP3A NOS ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL

RESUMO

Fármacos que são oralmente administrados necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade no trato gastrointestinal (TGI) para que ocorra uma boa biodisponibilidade. A solubilidade é considerada um importante fator para a solubilização de uma substância e um pré-requisito para a etapa seguinte: permeabilidade. Esta, por sua vez, é mais complexa e ocorre por meio de diferentes mecanismos através da parede intestinal. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que possibilita a classificação de fármacos de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade. O SCB representa um importante papel nos processos de desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações, além de auxiliar na bioisenção de fármacos classe I. Entretanto, não somente a solubilidade e a permeabilidade estão relacionadas com a biodisponibilidade, mas também outro fator de suma importância para as propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção): o metabolismo. Com base nisso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto como uma ferramenta complementar ao SCB que permite a classificação dos fármacos em quatro classes distintas de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Portanto, uma adequada biodisponibilidade oral depende, dentre outros fatores, das características de solubilidade, permeabilidade e metabolismo intestinal do fármaco. A metabolização de substâncias na parede dos enterócitos não é frequentemente considerada nas etapas iniciais de desenvolvimento, uma vez que ensaios de metabolismo hepático acabam recebendo o grande foco das pesquisas. Assim, o presente trabalho de revisão teve como objetivo apresentar a importância do metabolismo intestinal pela enzima CYP3A e sua influência na permeabilidade de fármacos administrados oralmente. Além disso, também é discutida a utilização de diferentes métodos que podem ser empregados nos estudos de metabolismo pré-sistêmico intestinal para identificar se um fármaco é ou não substrato de CYP3A.

Palavras-chave: metabolismo intestinal; enterócitos; CYP3A; SCB; SCBDF.

INTRODUÇÃO

Muitos medicamentos disponíveis comercialmente são destinados à administração oral. Neste caso, o fármaco necessita apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade no trato gastrointestinal (TGI) para que uma boa biodisponibilidade ocorra.

A solubilidade e a permeabilidade constituem importantes fatores para a predição da absorção oral de substâncias. Com base nestas características, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto por Amidon e colaboradores (1995) como uma ferramenta que possibilita a classificação dos fármacos em quatro classes: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Com base no SCB, a agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia dedicado aos processos de bioisenção de fármacos classe I (CDER/FDA, 2000, 2015a).

Uma vez que o SCB é baseado somente na solubilidade e na permeabilidade, outros fatores podem também influenciar de maneira significativa a biodisponibilidade *in vivo*, tal como o metabolismo. Este, por sua vez, está relacionado às propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Com base nisso, outro sistema de classificação denominado Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto por Wu e Benet (2005) e, assim como o SCB, também classifica os fármacos em quatro classes distintas: classe I (alta solubilidade e extenso metabolismo), classe II (baixa solubilidade e extenso metabolismo), classe III (alta solubilidade e baixo metabolismo) e classe IV (baixa solubilidade e baixo metabolismo) (HOSEY; CHAN; BENET, 2016; WU; BENET, 2005).

Além de permitir a classificação de fármacos, o SCBDF também está relacionado à avaliação da influência de transportadores em diferentes tecidos orgânicos, incluindo o TGI. Desta forma, as interações fármaco-fármaco ou fármaco-alimento podem ser previstas por este sistema (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; OLIVARES-MORALES et al., 2014).

Com base em problemas observados clinicamente, tal como a limitada biodisponibilidade *in vivo* para alguns fármacos, uma investigação mais aprofundada acerca dos processos de absorção por via oral deve ser realizada para

identificar os fatores envolvidos neste aspecto, tal como a presença de enzimas metabolizadoras nos enterócitos. Desta forma, além da solubilidade e da permeabilidade, a biodisponibilidade vai depender também da fração do fármaco que escapou do metabolismo pré-sistêmico (MUSTHER et al., 2014; OLIVARES-MORALES et al., 2014).

A presença de enzimas nos enterócitos forma uma barreira bioquímica à absorção e tem sido muito discutida nos últimos anos em função da sua influência significativa sobre a biodisponibilidade oral. Nas etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico, bem como em etapas de estudos clínicos, a avaliação do metabolismo pré-sistêmico pode auxiliar na tomada de decisões e no desenvolvimento de fármacos e formulações (PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

Alguns estudos descritos na literatura destacam as semelhanças e as diferenças entre a expressão de enzimas presentes nos hepatócitos e nos enterócitos. Entretanto, poucos estudos são realizados com o objetivo de avaliar o impacto do metabolismo intestinal na permeabilidade de fármacos (CUMMINS et al., 2003; KRISHNA; KLOTZ, 1994; LIN; LU, 2001; SJÖGREN et al., 2014; YANG et al., 2007).

Com base no exposto, o presente trabalho de revisão teve como objetivo apresentar a importância do metabolismo intestinal pela enzima CYP3A e sua influência na permeabilidade de fármacos oralmente administrados. Além disso, também é discutida a utilização de diferentes métodos empregados para avaliar a ocorrência de metabolismo intestinal e para identificar se determinado fármaco é ou não substrato da CYP3A.

Enzimas presentes no trato gastrintestinal (TGI)

A parede do TGI é considerada um dos maiores sítios extra-hepáticos onde ocorre a grande parte da metabolização de substâncias fora do fígado. A ocorrência de metabolismo nos enterócitos é de suma importância e deve ser investigada, uma vez que este fator representa grandes impactos na biodisponibilidade oral de fármacos.

Em função das diferenças na perfusão sanguínea no fígado e no intestino, o fármaco substrato de enzimas CYP possuem um maior tempo de permanência no interior dos enterócitos, o que favorece sua exposição às enzimas metabolizadoras (GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; LIN; LU, 2001; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; YANG et al., 2007).

Diferentes enzimas oxidativas (metabolismo de fase I) podem ser encontradas nos enterócitos, sendo as principais pertencentes ao citocromo P450 (CYP450), mais especificamente CYP3A4 e CYP3A5. Outras enzimas desta mesma família também podem ser encontradas em menor proporção: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2J2 (SJÖGREN et al., 2014).

No intestino, a maioria das enzimas encontradas pertencem à superfamília CYP3A e representam mais de 80% das enzimas presentes no TGI. Somente a CYP3A4 representa 70% do total de enzimas CYP450 presentes no intestino. A enzima CYP3A5 possui grande atividade metabólica e atua significativamente nos enterócitos, sendo mais facilmente encontrada no intestino do que no fígado (PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

Outros tipos de enzimas responsáveis pelo metabolismo de conjugação (fase II) também estão presentes na parede do TGI e podem causar importantes influências nos processos de absorção de fármacos substratos. Tais enzimas são denominadas UGT (uridinodifosfato glicuronosiltransferase) e podem impactar a biodisponibilidade de substâncias como raloxifeno e troglitazona (KEMP; FAN; STEVENS, 2002; WATANABE; NAKAJIMA; YOKOI, 2002).

Ao longo do TGI, a distribuição de enzimas é heterogênea, sendo a maior expressão de enzimas oxidativas encontrada nas porções proximais do intestino (GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; SJÖGREN et al., 2014).

A realização de estudos para avaliar a influência do metabolismo intestinal na permeabilidade de fármacos deve considerar a região intestinal de absorção devido à heterogeneidade da expressão enzimática. Além disso, o metabolismo intestinal está também condicionado às diferenças interindividuais, o que resulta em variações na biodisponibilidade quando diferentes etnias fazem uso do mesmo fármaco (GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014).

Métodos empregados nos estudos de metabolismo intestinal

A avaliação do metabolismo pré-sistêmico pode ser realizada por meio do uso de diferentes modelos descritos na literatura com a finalidade de identificar fármacos que atuam como substratos das enzimas metabolizadoras CYP3A. Uma vez que a ocorrência de metabolismo interfere nos processos de permeação do fármaco através do TGI, alguns modelos amplamente empregados nos estudos de permeabilidade podem também serem úteis nos estudos de metabolismo intestinal.

Modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* podem ser aplicados nos estudos de metabolismo intestinal para elucidar o comportamento de fármacos por meio de sua interação com as enzimas verificada na ausência e na presença de inibidores.

Ensaio em modelos *in vitro* incluem o emprego de culturas celulares transfectadas com o gene que permite a expressão das enzimas CYP3A. Experimentos *ex vivo* são baseados no uso de segmentos intestinais isolados provenientes de animais e/ou seres humanos. Alguns trabalhos descritos na literatura discutem as diferenças entre as espécies em relação à expressão enzimática nos enterócitos e os ratos são amplamente utilizados nos estudos de predição da absorção *in vivo* em função da boa correlação existente nos estudos de permeabilidade e metabolismo, especialmente para fármacos classe I do SCB (CAO et al., 2006; SJÖGREN et al., 2014).

Modelos *in vitro*

Células Caco-2 e MDCK

Células Caco-2 são derivadas de adenocarcinoma humano e são rotineiramente empregadas nos estudos de permeabilidade intestinal de fármacos por serem capazes de mimetizar o epitélio intestinal. Após a diferenciação, as monocamadas celulares apresentam microvilosidades, junções intercelulares e expressão de enzimas e transportadores, embora tais características sejam variáveis nesta linhagem celular (ARTURSSON; PALM; LUTHMANN, 2012; AVDEEF, 2003; KÜBLBECK et al., 2016).

A expressão de enzimas e transportadores em Caco-2 é variável e pode estar relacionada aos casos em que são observadas baixas correlações com outros modelos. A limitada expressão de enzimas CYP3A em células Caco-2 compromete a predição da absorção quando fármacos substratos de tais enzimas são avaliados (KÜBLBECK et al., 2016).

A transfecção do gene responsável pela expressão das enzimas CYP3A tem sido utilizada como estratégia para aumentar a atividade metabólica nas células Caco-2. O processo de transfecção ou a ativação das enzimas é baseada na exposição da cultura de células Caco-2 ao éster de forbol, ao butirato de sódio e à vitamina D3 e seus derivados. Este procedimento origina uma linhagem celular derivada conhecida como CYP3A4-Caco-2 (CUMMINS et al., 2003; KÜBLBECK et al., 2016).

O aumento na expressão e na atividade enzimática pela CYP em Caco-2 foi observado em um estudo conduzido por Kublbeck e colaboradores (2016). Para cada enzima avaliada, a inclusão de inibidores e substratos específicos nos experimentos permitiu avaliar a atividade enzimática, bem como auxiliar na identificação dos metabólitos formados. As principais enzimas encontradas nas células Caco-2 são apresentadas no Quadro 1.9. Também são apresentados seus respectivos substratos e metabólitos (KÜBLBECK et al., 2016).

Quadro 1.9: Tipos de enzimas CYP expressas pelas células Caco-2, seus substratos e metabólitos (adaptado de (KÜBLBECK et al., 2016)).

Enzima	Substrato	Metabólito
CYP1A2	melatonina	6-hidroxi melatonina
CYP2A6	cumarina	7-hidroxycumarina
CYP2B6	bupropiona	(2S,3S)-hidroxibupropiona
CYP2C9	diclofenaco	4-hidroxidiclofenaco
CYP2C19	omeprazol	5-hidroxiomeprazol
CYP3A4	midazolam	1-hidroxiimidazolam

É importante destacar ainda que para linhagens celulares transfectadas, não é possível realizar o controle do processo de transfecção. Em outras palavras, a expressão de enzimas não é totalmente controlada e outras mudanças morfológicas e/ou fisiológicas poderão ocorrer na nova linhagem celular obtida. Assim, o uso de inibidores e de substratos específicos de enzimas CYP nos experimentos deve ser considerado.

Um estudo em modelo celular CYP3A4-Caco-2 foi realizado por Cummins e colaboradores (2004) para avaliar a barreira bioquímica à absorção de substâncias. O midazolam foi empregado como substrato de CYP3A4, enquanto o sirolimo foi utilizado como substrato de CYP3A4 e P-gp. O emprego de inibidores de CYP e P-gp permitiram concluir que as células transfectadas CYP3A4-Caco-2 podem ser empregadas nos estudos de efluxo e metabolismo (CUMMINS et al., 2004).

Outro tipo de cultura celular que pode ser empregada nos estudos de metabolismo intestinal inclui o uso de células MDCK transfectadas com os genes para expressão das enzimas CYP3A4 e para expressão de P-gp (células MMC). Esta linhagem foi descrita por Kwatra e colaboradores (2012) e os estudos comparativos entre MDCK (linhagem selvagem), MDCK-MDR1 (para expressão de P-gp) e MMC (para expressão de CYP3A4 e P-gp) indicou que esta linhagem pode ser útil na avaliação das interações fármaco-P-gp-CYP, uma vez que o cortisol apresentou o menor resultado de transporte em MMC em comparação com o MDCK. A permeabilidade do cortisol nesse experimento aumentou em cerca de três vezes quando a morfina foi adicionada como inibidor de CYP3A4 (KWATRA et al., 2012).

Microsomas

Estudos *in vitro* que empregam microsomas são simples e rápidos de serem executados. Além disso, este modelo *in vitro* permite avaliar a influência do metabolismo intestinal e hepático na biodisponibilidade fármacos administrados oralmente. Existem diferentes tipos de microsomas disponíveis comercialmente, de origem animal ou humana, que permitem fazer uma comparação entre as espécies e entre os diferentes tipos de enzimas (CHIBA; HENSLEIGH; LIN, 1997; GAO et al., 2015).

Em estudo conduzido por Chiba, Hensleigh e Lin (1997), o metabolismo intestinal e o metabolismo hepático foram avaliados para o fármaco indinavir por meio do uso de microssomas provenientes de ratos e de seres humanos. O cetoconazol foi adicionado aos ensaios como inibidor das enzimas CYP3A e os resultados demonstraram que o metabolismo hepático foi mais expressivo que o metabolismo intestinal tanto em ratos quanto em seres humanos, o que demonstra a significativa atividade enzimática no metabolismo hepático do indinavir (CHIBA; HENSLEIGH; LIN, 1997). Assim, a atividade das enzimas CYP3A pode ocorrer de maneira diferenciada dependendo do sítio metabólico (MOULY et al., 2005).

A utilização de microssomas para os ensaios de metabolismo é importante nas etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico para auxiliar na determinação do principal sítio metabólico de uma substância. Por outro lado, fatores que não estão envolvidos neste modelo *in vitro* podem interferir na avaliação do impacto do metabolismo sobre a permeabilidade de determinado fármaco, tais como: ausência de fluxo sanguíneo hepático/intestinal, ligação às proteínas plasmáticas e interações com transportadores (VAN HERWAARDEN; VAN WATERSCHOOT; SCHINKEL, 2009).

Métodos ex vivo

Homogenato intestinal

Estudos em homogenatos são mais laboriosos em comparação com os modelos *in vitro*. Porém, é possível preparar homogenatos provenientes de regiões específicas do intestino delgado para ensaios comparativos (duodeno, jejuno e íleo) com a finalidade de investigar a ocorrência de metabolismo local-dependente.

Em um estudo conduzido por Li e colaboradores, o metabolismo intestinal da puerarina foi investigado por meio do preparo de homogenato intestinal. O segmento de intestino foi obtido a partir de ratos Sprague-Dawley e foi lavado com solução gelada de KCl 1,15%. A porção intestinal foi homogeneizada com solução tampão HEPES pH 7,4 e KCl 1,15%. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 9000 g por 20 minutos e a fração S9 foi obtida como sobrenadante, a qual foi incubada com a puerarina por 30 minutos a 37°C. Os resultados demonstraram que a

substância estudada apresenta baixa taxa de metabolização na parede intestinal (LI et al., 2014).

Sacos invertidos

O modelo de saco invertido consiste na utilização de um segmento intestinal isolado que foi invertido com o auxílio de um bastão de vidro, ou outro objeto semelhante, de modo a formar um saco. Esta técnica é muito utilizada em estudos de permeabilidade e transporte de fármacos e pode também ser empregada nos estudos de metabolismo intestinal desde que a viabilidade e a integridade do segmento intestinal seja assegurada (ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2012; LUO et al., 2013).

A metabolização intestinal da metadona foi avaliada por Bouër e colaboradores (1999) por meio do modelo de saco invertido utilizando segmentos intestinais de ratos Sprague-Dawley. Os resultados mostraram que tanto a metadona quanto seu metabólito foram encontrados no interior do saco intestinal, o que indicou que o fármaco sofreu metabolismo intestinal pela ação das enzimas CYP3A4, o que pode explicar sua biodisponibilidade *in vivo* limitada (BOUËR et al., 1999).

Em outro estudo realizado em sacos invertidos, o metabolismo do midazolam foi avaliado por Arellano e colaboradores (2007). A taxa de metabolização desta substância, a qual é conhecida como sendo substrato de enzimas CYP3A4, foi elevada. Assim, o modelo de saco invertido mostrou-se adequado para avaliar o metabolismo intestinal de substâncias (ARELLANO et al., 2007).

Embora a metodologia de sacos invertidos seja bem consolidada na literatura, o uso deste modelo é limitado em função das dificuldades em manter a viabilidade e a integridade do segmento intestinal submetido ao estudo. A extensa manipulação e o tempo de experimento podem comprometer a atividade enzimática e, consequentemente, os resultados obtidos. A ação das enzimas metabolizadoras ocorre de maneira satisfatória em um período de até duas horas de ensaio, desde que as condições fisiológicas sejam mantidas (ALAM; AL-JENOABI; AL-MOHIZEA, 2012; LUO et al., 2013).

Segmentos intestinais em câmaras de difusão

O uso de segmentos intestinais isolados em câmaras de difusão é comum nos estudos de permeabilidade e transporte de fármacos. O uso de inibidores de enzimas CYP3A pode auxiliar o estudo de metabolismo intestinal conduzido neste modelo. Para a realização dos experimentos em câmaras de difusão, uma porção do segmento intestinal é posicionado entre dois compartimentos (doador e receptor). Dois tipos de equipamento podem ser utilizados neste modelo: câmaras de difusão horizontal tipo Ussing e câmaras de difusão vertical tipo Franz (DEZANI et al., 2013; LAMPEN et al., 1996; REIS et al., 2013; SJÖBERG et al., 2013; SÖDERHOLM et al., 1998).

É possível, por meio deste modelo, realizar experimentos com o uso de segmentos intestinais de diferentes origens, inclusive humana. Além disso, a investigação do metabolismo local-dependente também pode ser realizada para identificar o principal sítio metabólico, uma vez que a expressão de enzimas ao longo do TGI é heterogênea (LAMPEN et al., 1996; MIYAKE et al., 2013; ROZEHNAL et al., 2012; SJÖBERG et al., 2013; SÖDERHOLM et al., 1998).

Em um estudo realizado por Lampen e colaboradores (1996), o metabolismo do tacrolimo foi avaliado em segmentos intestinais isolados de porco em câmaras de Ussing. Os resultados indicaram que a substância sofreu metabolização nas porções proximais do intestino delgado (duodeno). Além disso, os metabólitos foram encontrados nos dois compartimentos (lado apical e lado basolateral), o que sugeriu o efluxo dos metabólitos. Assim, a baixa biodisponibilidade do tacrolimo está relacionada ao metabolismo pré-sistêmico intestinal (LAMPEN et al., 1996).

Método de perfusão *in situ*

Os estudos de perfusão *in situ* são normalmente realizados em animais de pequeno porte, como ratos. Uma vez anestesiados, o segmento intestinal é cuidadosamente canulado e o fármaco é perfundido no interior do intestino a um fluxo constante. As amostras são coletadas em intervalos de tempo predeterminados. Por meio deste experimento, é possível obter resultados que permitem avaliar a cinética de absorção de fármacos e a influência de

transportadores e enzimas na permeabilidade intestinal (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016, 2017).

O modelo de perfusão *in situ* possui a grande vantagem de manter as condições fisiológicas próximas das condições *in vivo*. Assim, o suprimento sanguíneo e a inervação permanecem intactos durante a realização dos experimentos. Além disso, transportadores e enzimas presentes nos enterócitos permanecem ativos (DEZANI et al., 2016, 2017; LIN et al., 2003).

A influência da P-gp e das enzimas CYP3A foi avaliada por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico realizado em ratos. Neste estudo, foi verificado que o transportador de efluxo e a enzima agem de maneira coordenada para controlar a entrada de substâncias e xenobióticos no organismo, o que ocorre para alguns fármacos administrados oralmente. Desta forma, a ação da P-gp limita a entrada de fármacos no interior dos enterócitos, o que evita a saturação das enzimas oxidativas e, conseqüentemente, limitando o processo absorptivo pela ação do mecanismo de efluxo e pela metabolização (CUMMINS et al., 2003).

Embora o modelo de perfusão *in situ* seja o mais próximo das condições *in vivo*, cuidados devem ser tomados nos procedimentos cirúrgicos para que não haja o comprometimento dos resultados obtidos (DEZANI et al., 2016, 2017; JUNIOR et al., 2015; LIN et al., 2003).

CONCLUSÃO

O estudo de metabolismo pré-sistêmico visa investigar a influência de enzimas CYP3A, uma vez que estas estão em maior proporção nos enterócitos e apresentam elevada atividade metabólica. Embora sejam raramente descritos na literatura, os estudos de metabolismo intestinal são importantes para compreender os mecanismos limitantes da biodisponibilidade oral (SJÖGREN et al., 2014).

É inegável que os estudos de metabolismo são indispensáveis antes de disponibilizar um medicamento no mercado. Os ensaios clínicos *in vivo* são extremamente caros e burocráticos e envolvem grandes questões éticas. Além disso, a realização de estudos *in vivo* não permite determinar com precisão o sítio metabólico de um fármaco.

Com base no exposto, o uso de modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* permitem avaliar se o metabolismo intestinal que ocorre nos enterócitos compromete a biodisponibilidade oral de um fármaco. Desta forma, é possível estudar o uso de excipientes nas formulações a fim de contornar esse mecanismo limitante da absorção.

Os ensaios em modelos *in vitro* com o uso de microssomas e de culturas celulares Caco-2 ou MDCK transfectadas com o gene para expressão de CYP3A constituem experimentos rápidos e de baixo custo em relação aos estudos *in vivo*, *ex vivo* e *in situ*. Neste modelo, a interação fármaco-enzima pode ser avaliada com maior precisão, porém com um valor preditivo menor em relação ao real impacto clínico desta interação, o que pode ser melhor avaliado em modelos de perfusão *in situ*.

Entretanto, é importante destacar que a superexpressão de enzimas CYP em culturas celulares e a elevada concentração de enzimas em microssomas não representam necessariamente a expressão enzimática encontrada *in vivo*. Assim, a taxa de metabolização observada nestes ensaios pode não refletir a situação *in vivo* e não causar grandes impactos na biodisponibilidade dos fármacos avaliados.

Desta forma, os estudos em modelos que mais se aproximam das condições *in vivo* representam com maior clareza o impacto da interação fármaco-enzima na predição da absorção oral. Assim, uma vez constatada a interação entre o fármaco e a enzima estudada em um modelo *in vitro*, é recomendável realizar adicionalmente os experimentos em modelos que empregam segmentos intestinais com o intuito de prever a importância de tal interação na absorção oral de fármacos.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. A.; AL-JENOABI, F. I.; AL-MOHIZEA, A. M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 326–336, 2012.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ARELLANO, C. et al. The metabolism of midazolam and comparison with other CYP enzyme substrates during intestinal absorption: In vitro studies with rat everted gut sacs. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 26–36, 2007.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMANN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 280–289, 2012.

AVDEEF, A. **Absorption and Drug Development**: solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

BENET, L. Z. The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BOUËR, R. et al. The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 494–500, 1999.

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, 2015.

CHIBA, M.; HENSLEIGH, M.; LIN, J. H. Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes: Major role of CYP3A. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 8, p. 1187–1195, 1997.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

CUMMINS, C. L. et al. CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 1, p. 143–155, 2004.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

GALETIN, A.; GERTZ, M.; HOUSTON, J. B. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 25, n. 1, p. 28–47, 2010.

GAO, C. et al. Interaction between oblongifolin C and UDP-glucuronosyltransferase isoforms in human liver and intestine microsomes. **Xenobiotica**, v. 45, n. 7, p. 578–585, 3 jul. 2015.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KEMP, D. C.; FAN, P. W.; STEVENS, J. C. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: Contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 6, p. 694–700, 2002.

KRISHNA, D. R.; KLOTZ, U. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 26, n. 2, p. 144–160, 1994.

KÜBLBECK, J. et al. Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic **Capacity**. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 2, p. 941–949, 2016.

KWATRA, D. et al. Transfected MDCK Cell Line with Enhanced Expression of CYP3A4 and P-Glycoprotein as a Model To Study Their Role in Drug Transport and Metabolism. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 7, p. 1877–1886, 2 jul. 2012.

LAMPEN, A. et al. Metabolism of the macrolide immunosuppressant, tacrolimus, by the pig gut mucosa in the Ussing chamber. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 8, p. 1730–1734, 1996.

LI, H. et al. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1–2, p. 133–138, 2014.

LIN, J. et al. The Role of Absorption , Distribution , Metabolism , Excretion and Toxicity in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1125–1154, 2003.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 535–567, 2001.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MIYAKE, M. et al. Establishment of novel prediction system of intestinal absorption in humans using human intestinal tissues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2564–2571, 2013.

MOULY, S. J. et al. Variation in oral clearance of saquinavir is predicted by CYP3A5*1 genotype but not by enterocyte content of cytochrome P450 3A5. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 78, n. 6, p. 605–618, 2005.

MUSTHER, H. et al. Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 280–291, 2014.

OLIVARES-MORALES, A. et al. The use of ROC analysis for the qualitative prediction of human oral bioavailability from animal data. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 3, p. 720–730, 2014.

PEREIRA DE SOUSA, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome it. **Journal of Controlled Release**, 2014.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

ROZEHNAL, V. et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 367–373, 2012.

SJÖBERG, Å. et al. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 166–180, 2013.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 99–151, 2014.

SÖDERHOLM, J. D. et al. Integrity and metabolism of human ileal mucosa in vitro in the Ussing chamber. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 162, n. 1, p. 47–56, 1998.

VAN HERWAARDEN, A. E.; VAN WATERSCHOOT, R. A. B.; SCHINKEL, A. H. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 5, p. 223–227, 2009.

WATANABE, Y.; NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: High catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 12, p. 1462–1469, 2002.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

YANG, J. et al. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 7, p. 676–684, 2007.

**CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DOS
FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS
MODELOS DE PERFUSÃO *IN SITU* EM RATOS E *IN*
VITRO EM CULTURAS CELULARES MDCK**

RESUMO

Fármacos que são oralmente administrados necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade no trato gastrointestinal (TGI) para que ocorra a sua consequente absorção. Assim, dentre outros fatores mais complexos, essas duas características são de suma importância não somente para o processo de absorção oral, mas também para a biodisponibilidade. Desta forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma importante ferramenta que classifica os fármacos de acordo com suas características de solubilidade e de permeabilidade. Além disso, o SCB representa um importante papel no desenvolvimento de novos fármacos, novas formulações farmacêuticas e nos processos de bioisenção de substâncias altamente solúveis e altamente permeáveis. Dentre os variados métodos empregados para a caracterização da permeabilidade, destacam-se os modelos de perfusão *in situ* e *in vitro* em culturas celulares MDCK em função de suas vantagens e elevada capacidade preditiva. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) por meio do modelo de perfusão *in situ* e do modelo *in vitro* em células MDCK. Além disso, o presente trabalho também se propôs a prever a permeabilidade efetiva ($P_{ef, humanos}$) e a fração absorvida (F_a) em seres humanos a partir dos resultados obtidos em ratos. As substâncias escolhidas para o estudo são amplamente empregadas na farmacoterapia contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Entretanto, os valores de biodisponibilidade *in vivo* para tais fármacos apresentam-se variáveis, o que pode estar relacionado aos mecanismos de transporte pelos quais os compostos atravessam a parede do TGI. Os experimentos de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* foram realizados em ratos machos Wistar. Uma porção de 10 cm do jejuno foi selecionada e cuidadosamente canulada. Em seguida, cada um dos fármacos foi adicionado no interior do segmento intestinal e amostras de perfusato foram coletadas em intervalos regulares de tempo para obtenção dos resultados de permeabilidade efetiva (P_{ef}). Foram também realizadas coletas de sangue mesentérico com a finalidade de avaliar o aparecimento do fármaco na circulação sanguínea, o que permitiu obter a permeabilidade aparente (P_{ap}). De maneira complementar, estudos bidirecionais de permeabilidade foram realizados em células MDCK no sentido apical-basolateral (A→B) e basolateral-apical (B→A), com o propósito de avaliar o transporte dos fármacos antirretrovirais neste modelo *in vitro*. O metoprolol (METO) e a ranitidina (RNT) foram empregados em todos os experimentos como marcadores de alta e de baixa permeabilidade, respectivamente. Os resultados de P_{ef} obtidos a partir dos estudos em modelo de perfusão *in situ* foram: $5,63 \pm 0,47 \times 10^{-5}$ cm/s para METO; $1,94 \pm 0,17 \times 10^{-5}$ cm/s para RNT; $4,18 \pm 0,34 \times 10^{-5}$ cm/s para d4T; $3,16 \pm 0,90 \times 10^{-5}$ cm/s para 3TC e $4,37 \pm 0,45 \times 10^{-5}$ cm/s para AZT. Os resultados de P_{ap} obtidos a partir dos experimentos de perfusão *in situ* foram: $0,55 \pm 0,049 \times 10^{-5}$ cm/s para METO; $0,17 \pm 0,020 \times 10^{-5}$ cm/s para RNT; $0,49 \pm 0,074 \times 10^{-5}$ cm/s para d4T; $0,23 \pm 0,050 \times 10^{-5}$ cm/s para 3TC e $0,50 \pm 0,031 \times 10^{-5}$ cm/s para AZT. A partir dos resultados de P_{ef} obtidos em ratos, foram calculadas a P_{ef} e F_a preditas para seres humanos, cujos resultados foram, respectivamente: $20,6 \times 10^{-5}$ cm/s e 88% para METO; $7,3 \times 10^{-5}$ cm/s e 53% para RNT; $15,3 \times 10^{-5}$ cm/s e 80% para d4T; $11,7 \times 10^{-5}$ cm/s e 70% para 3TC e $16,0 \times 10^{-5}$ cm/s e 81% para AZT. Os resultados de P_{ap} obtidos a partir dos ensaios realizados em MDCK na direção A→B foram: $1,06 \pm 0,130 \times 10^{-5}$ cm/s para METO, $0,03 \pm 0,005 \times 10^{-5}$ cm/s para RNT, $0,06 \pm 0,004 \times 10^{-5}$ cm/s para d4T, $0,03 \pm 0,003 \times 10^{-5}$ cm/s para 3TC e $0,16 \pm 0,015 \times 10^{-5}$ cm/s para AZT. Já os resultados de P_{ap} em MDCK na direção B→A foram: $0,60 \pm 0,098 \times 10^{-5}$ cm/s para METO, $0,04 \pm 0,005 \times 10^{-5}$ cm/s para RNT, $0,08 \pm 0,007 \times 10^{-5}$ cm/s para d4T, $0,08 \pm 0,013 \times 10^{-5}$ cm/s para 3TC e

$0,16 \pm 0,008 \times 10^{-5}$ cm/s para AZT. Com base nos dados obtidos, o METO apresentou os maiores valores de permeabilidade, enquanto a RNT apresentou os menores valores para todos os ensaios realizados (perfusão *in situ* e MDCK). Tal constatação indica que os modelos foram capazes de diferenciar o comportamento de permeabilidade dos dois marcadores, indicando as características de alta e de baixa permeabilidade. Nos ensaios de perfusão *in situ*, tanto a d4T quanto a AZT apresentaram resultados de P_{ef} e de P_{ap} estatisticamente semelhantes entre si e em relação aos resultados de METO, o que indica a alta permeabilidade destas duas substâncias. Entretanto, os resultados de P_{ef} e de P_{ap} da 3TC obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* indicaram que este fármaco é estatisticamente diferente do METO, mas não da RNT, o que sugere sua baixa capacidade de permeação através do segmento intestinal selecionado para o estudo. Quanto aos resultados em MDCK, os valores de permeabilidade bidirecional da AZT indicaram que este fármaco foi transportado igualmente tanto no sentido A→B quanto no sentido B→A. Entretanto, os valores referentes à d4T e à 3TC são estatisticamente diferentes quando resultados de A→B e B→A são comparados. Não obstante, nenhum dos três antirretrovirais estudados apresentaram resultados de P_{ap} semelhantes aos valores de METO em nenhuma direção do estudo em células MDCK. Assim, os resultados de permeabilidade dos antirretrovirais obtidos em MDCK sugerem que a via transcelular passiva não constitui o principal mecanismo de transporte dos fármacos estudados, o que não pôde ser constatado com base somente nos resultados obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ*. Dessa forma, fundamentado nestas constatações, os fármacos antirretrovirais d4T e AZT podem ser considerados como sendo de alta permeabilidade (classe I do SCB), enquanto que a 3TC pode ser considerada de baixa permeabilidade (classe III do SCB). Além disso, a possível interação entre fármaco e carreadores representaria maior impacto clínico para a 3TC, uma vez que esta substância apresentou os menores valores de permeabilidade em ambos os modelos empregados, o que corrobora com a F_a em seres humanos relatada na literatura.

Palavras-chave: antirretrovirais; *in vitro*; MDCK, perfusão *in situ*, permeabilidade.

INTRODUÇÃO

A via oral é a principal rota de administração de medicamentos. Desta forma, as características de solubilidade e de permeabilidade de fármacos representam importantes etapas que antecedem a absorção. Baseado nisso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma importante ferramenta utilizada na classificação de fármacos em quatro classes distintas de acordo com as características supracitadas: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Com base no SCB, a agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) publicou em 2000 um guia destinado aos processos de bioisenção, ou seja, isenção de ensaios clínicos *in vivo* em voluntários sadios para fármacos classe I. Este guia descreve os ensaios de solubilidade e de permeabilidade, além de apresentar critérios para a classificação de fármacos (CDER/FDA, 2000; VOLPE, 2008). Atualmente, uma nova versão do referido documento está sendo revista pela FDA em relação à condução dos experimentos de solubilidade/permeabilidade para fins de classificação biofarmacêutica e deve ser sancionada em substituição ao guia atual dentro dos próximos meses (CDER/FDA, 2015a).

De maneira análoga, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um guia para a isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para fármacos classe I (Resolução RDC n° 37) e uma lista de fármacos candidatos à bioisenção com base no SCB (Instrução Normativa IN n°10) (ANVISA/BRASIL, 2012, 2016).

Os ensaios de solubilidade e de permeabilidade, de acordo com as preconizações da FDA, permitem avaliar os efeitos de solventes e excipientes nos processos de absorção oral (CDER/FDA, 2015a; TRAPANI et al., 2004). Além disso, os ensaios de permeabilidade permitem avaliar os mecanismos de transporte pelos quais os fármacos estão sujeitos nos processos de absorção, tais como: transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose (DEZANI et al., 2017; SHUGARTS; BENET, 2009)

Para os estudos de permeabilidade de fármacos, diferentes métodos têm sido descritos na literatura, tais como: computacional *in silico*, *in vitro* com o emprego de membranas artificiais, *in vitro* com o emprego de culturas celulares, ex

vivo com o emprego de segmentos intestinais isolados, perfusão intestinal *in situ* ou *in vivo* em animais e perfusão intestinal *in vivo* em seres humanos (BOHETS et al., 2001; CDER/FDA, 2000, 2015a, DEZANI et al., 2013, 2017; REIS et al., 2013).

O modelo *in silico* é baseado no uso de programas computacionais e é de fácil execução. Tais programas consideram as características físico-químicas das moléculas, como peso e tamanho molecular, área de superfície polar, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, pKa, lipofilicidade e carga/ionização. Embora tais características se relacionem com o comportamento do fármaco *in vivo*, essas são, ainda, limitadas e com baixo valor preditivo devido à incapacidade de prever a interação entre o fármaco e a membrana biológica. Assim, o modelo *in silico* não é considerado pela FDA como um método adequado para avaliar a permeabilidade de fármacos e nem para a classificação biofarmacêutica devido à inconsistência de dados (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; CDER/FDA, 2000, 2015a; GRASS, 1997).

O método *in vitro* baseado em sistemas de membranas artificiais, tais como PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), é amplamente utilizado em estágios de seleção de novas moléculas candidatas a fármacos por ser um ensaio de baixo custo e elevado rendimento, ou seja, são ensaios de rápida execução onde é possível avaliar diferentes substâncias em diferentes condições. Como a maioria dos fármacos destinados à absorção oral são frequentemente planejados para serem transportados principalmente ou parcialmente por via transcelular passiva, o método PAMPA apresenta-se adequado para este propósito, embora outros mecanismos de transporte estejam ausentes, o que não necessariamente indica a baixa permeabilidade de um composto quando este é transportado por outras vias que não a transcelular passiva (BUCKLEY et al., 2012; DEZANI et al., 2017; KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; REIS et al., 2013).

O modelo *ex vivo* constitui o emprego de segmentos intestinais isolados provenientes de animais. Duas técnicas têm sido amplamente descritas na literatura: saco invertido e câmaras de difusão tipo Ussing e tipo Franz. Embora o equipamento de câmaras de difusão vertical tipo Franz tenha sido amplamente utilizado em ensaios de permeação cutânea, estudos recentes indicam seu uso para avaliar a permeabilidade de fármacos oralmente administrados. Diferentemente dos modelos *in silico* e *in vitro* PAMPA apresentados anteriormente, o método *ex vivo* demonstra como grande vantagem a expressão da maioria dos

carreadores de influxo e de efluxo encontrados na situação *in vivo*, o que permite obter elevados valores de correlação entre este modelo e os ensaios *in vivo* em ratos e em seres humanos. Entretanto, a ausência de habilidade e a extensa manipulação do segmento intestinal estão relacionadas aos resultados divergentes constatados em alguns trabalhos descritos na literatura (DEZANI et al., 2013; HERAI et al., 2007; PRETORIUS; BOUIC, 2009; REIS et al., 2013; TUKKER, 2000; ŽAKELJ; ŠTURM; KRISTL, 2006).

Muitos estudos de permeabilidade são conduzidos em modelos *in vitro* com o emprego de culturas celulares. Atualmente, diferentes linhagens estão disponíveis para tais ensaios, sendo as mais difundidas as células Caco-2 (derivadas de adenocarcinoma humano) e a MDCK (provenientes de rim canino). Entretanto, as células Caco-2 apresentam variações na expressão de carreadores, risco elevado de contaminação por microrganismos, longo período de crescimento, variação na idade celular, junções intercelulares mais justapostas e formação de camada de água estacionária (CAE) mais espessa que na situação *in vivo*. Desta forma, divergências nos resultados de permeabilidade têm sido reportadas na literatura (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

O modelo de perfusão *in situ* realizado em animais é bem descrito na literatura, enquanto que estudos de permeabilidade que empregam o modelo de perfusão *in vivo* em seres humanos são mais raramente reportados. Isto se deve, dentre outros fatores, às questões éticas e burocráticas envolvidas. Entretanto, ambos os modelos apresentam uma boa correlação com a F_a e mostram-se mais próximos das condições *in vivo* devido à preservação do suprimento sanguíneo e inervação. Os estudos de perfusão *in situ* incluem diferentes técnicas, sendo a mais difundida a perfusão intestinal de passagem simples (*Single-Pass Intestinal Perfusion*), a qual consiste na perfusão da solução contendo o fármaco solubilizado no interior do segmento intestinal (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2016, 2017; JUNIOR et al., 2015).

O modelo de perfusão *in situ* pode ser melhor explorado quando existe a possibilidade de realizar coletas de sangue em paralelo às coletas de perfusato. Neste caso, há a necessidade de manter as condições dos ensaios quanto aos parâmetros hemodinâmicos para que não ocorra comprometimento dos resultados obtidos. A grande vantagem deste modelo é a obtenção de resultados de

permeabilidade mais condizentes com as situações *in vivo*, uma vez que a perfusão *in situ* baseada somente na coleta de amostras de perfusato não é capaz de prever totalmente a interação de determinado fármaco com a membrana biológica (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017).

Com base no exposto, a caracterização da solubilidade e da permeabilidade de fármacos tem se mostrado de grande relevância. A avaliação da permeabilidade requer a associação de diferentes métodos, o que tem sido amplamente recomendado, uma vez que um único modelo não é capaz de elucidar os diferentes mecanismos que podem estar envolvidos nos processos de absorção (DEZANI et al., 2013; REIS et al., 2013). Assim, a avaliação da permeabilidade de fármacos com o emprego de culturas celulares e com o uso do modelo de perfusão *in situ* pode fornecer importantes informações com relação aos mecanismos de transporte envolvidos na absorção oral de substâncias (JUNIOR et al., 2015; REIS et al., 2013). As principais características relacionadas ao modelo *in vitro* com o uso de culturas celulares MDCK e ao modelo de perfusão *in situ* estão descritas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1: Comparação das principais características dos ensaios realizados em modelo *in vitro* MDCK e em modelo de perfusão intestinal *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

Características	MDCK (método <i>in vitro</i>)	Perfusão intestinal <i>in situ</i> com coleta de sangue mesentérico
Material usado nos ensaios	Monocamada celular MDCK	Segmento intestinal de rato (procedimento cirúrgico sob anestesia)
Mecanismos de transporte avaliados	Transporte passivo transcelular e transporte passivo paracelular	Transporte passivo transcelular, transporte passivo paracelular, transporte ativo mediado por carreadores de influxo, transporte ativo mediado por carreadores de efluxo e endocitose
Quantificação das amostras	CLAE* ou LC-MS/MS**	CLAE* ou LC-MS/MS**
Custo envolvido^a	Baixo	Moderado
Tempo de ensaio^b	Moderado	Longo
Valor preditivo	Moderado	Alto
Questões éticas	Não relevante	Relevante e requer aprovação por Comissão de Ética em razão do uso de animais

* CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

** LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

^a Custo envolvido: quando comparado aos estudos *in vivo*

^b Tempo de ensaio: quando comparado aos estudos *in vivo*

Embora a classificação biofarmacêutica de fármacos tem sido amplamente discutida e determinada desde a publicação do guia da FDA, muitos compostos disponíveis comercialmente ainda apresentam divergências quanto às suas

classificações com base no SCB. Em alguns casos, os problemas observados na biodisponibilidade *in vivo* podem estar relacionados às limitações nos processos absorptivos, o que pode estar associado a variações na biodisponibilidade de fármacos antirretrovirais.

Os fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) atuam como inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e são amplamente empregados na farmacoterapia de combate à Aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (AIDSINFO, 2017; CHECA et al., 2005). Alguns estudos de transporte podem ser encontrados na literatura em diferentes modelos. Porém, tais resultados não permitem avaliar com maior precisão os possíveis mecanismos de transporte envolvidos na absorção oral dos referidos fármacos (DE SOUZA et al., 2009; DEZANI et al., 2013, 2016; REIS et al., 2013; SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2013; STRAUCH et al., 2011).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico e do modelo *in vitro* com o emprego de células MDCK.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foram gentilmente doados por Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil) e pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil). Os marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol (METO) e ranitidina (RNT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Acetonitrila e metanol de grau cromatográfico, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e ácido ortofosfórico (H_3PO_4) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultrapurificada foi obtida a partir do sistema de ultrapurificação Milli-Q (Millipore, MA, EUA).

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), manitol, polietilenoglicol 4000 (PEG-4000) e D-glicose foram utilizados no preparo da solução de perfusão nos ensaios de perfusão *in situ* (DEZANI et al., 2016; JAIN et al., 2007).

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), hidróxido de sódio (NaOH) e DMSO (dimetilsufóxido) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A linhagem celular MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) foi obtida através do Dr. Ira Paston (NCI/NIH) e fornecida pela Unidade de Cultura Celular da Universidade da Califórnia San Francisco (UCC/UCSF).

Solução tampão de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), solução penicilina-estreptomicina, soro bovino fetal (SBF), solução tampão fosfato salino (PBS), solução de tripsina com EDTA, solução de Hanks e solução de HEPES foram obtidos da UCC/UCSF.

Frascos para cultivo celular T-75 e suportes com filtro permeável (*inserts*) para cultivo celular (poro de 0,4 μm) foram obtidos da BD Falcon, enquanto que as placas para cultivo celular (placas *transwell*) com seis poços foram adquiridos da Corning Incorporated (New York, NY, EUA).

Avaliação da permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

Previamente aos estudos de permeabilidade, o presente trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) e obteve resposta favorável à execução dos experimentos sob o número de protocolo P404.

Obtenção de sangue a partir de ratos doadores

Ratos machos da linhagem Wistar foram empregados como doadores de sangue para os ensaios de perfusão *in situ* (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

A preparação prévia dos animais seguiu o mesmo protocolo adotado para o jejum e para o procedimento anestésico utilizado nos ratos destinados aos ensaios de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

Os animais selecionados como doadores foram submetidos a um período de jejum de 12 horas. Em seguida, os ratos foram anestesiados com mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente). Após a constatação do estado anestésico profundo, foi realizada punção intracardiaca com seringa contendo anticoagulante CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose e adenina).

O sangue dos animais doadores foi coletado sob condições assépticas na véspera dos experimentos de perfusão *in situ*.

Preparo da solução de perfusão

A solução de perfusão utilizada nos estudos de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* foi preparada de acordo com a seguinte composição: NaCl 48 mM, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 28 mM, NaH₂PO₄ 43 mM, manitol 35 mM, PEG 4000 1g/L e D-glicose anidra 10 mM (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007). Todos os componentes foram adicionados em água ultrapurificada

(Milli-Q) até a completa solubilização dos componentes. Conforme a necessidade, foram utilizadas soluções de HCl ou KOH para o ajuste do pH em 6,5 (DEZANI et al., 2016; ERIKSSON et al., 2010; RATHORE et al., 2008). A solução pronta foi degaseificada em banho de ultrassom por 30 minutos antes da sua utilização nos experimentos.

A solução de perfusão isenta de fármaco foi utilizada como branco nos estudos de perfusão *in situ*.

Cada fármaco ou marcador foi solubilizado de maneira individualizada na solução de perfusão com base na maior dose comercialmente disponível, de acordo com a FDA. Para determinar a concentração de cada substância, dividiu-se a dose por 250 mL. Este volume deve ser considerado com o propósito de obter a maior concentração de fármaco disponível no lúmen intestinal (CDER/FDA, 2000, 2015a; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013). O Quadro 2.2 apresenta as concentrações de cada substância utilizada nos ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

Quadro 2.2: Concentração dos fármacos e das substâncias marcadoras na solução de perfusão utilizada nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

Fármaco/marcador	Maior dose prescrita (mg)*	Concentração da substância na solução de perfusão (mg/mL)
d4T	40	0,16
3TC	300	1,20
AZT	300	1,20
METO	100	0,40
RNT	300	1,20

* Fonte: FDA, 2017.

Ensaio de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

Os ensaios de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* foram realizados em ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com peso entre 250-300g fornecidos pelo biotério do Conjunto das Químicas. Os animais foram submetidos a 12 horas de jejum com acesso livre à água. Em seguida, os ratos foram anestesiados com injeção intramuscular de mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente). As manutenções anestésicas foram realizadas de acordo com a necessidade com utilização de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ da dose inicial (DEZANI et al., 2016, 2017; LI et al., 2011).

Após a constatação do estado anestésico, os animais foram acomodados em superfície aquecida a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ para melhor conforto e manutenção da anestesia (DEZANI et al., 2016, 2017).

Uma incisão abdominal foi realizada para expor o intestino. Cerca de 10 cm do jejuno foi selecionado para os estudos de perfusão *in situ* e uma cânula plástica foi cuidadosamente inserida nas porções proximal e distal de cada segmento intestinal. A cânula localizada na região proximal foi conectada à bomba peristáltica para uniformizar o fluxo de entrada da solução de perfusão, enquanto que a cânula localizada na porção distal permitiu a coleta das amostras de perfusato em intervalos de tempo predefinidos. Durante todo o período do experimento, os animais foram monitorados e o intestino exposto foi mantido úmido e aquecido com solução fisiológica a 37°C (BERGGREN et al., 2004; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; KIM et al., 2006).

Após a seleção do trecho intestinal de interesse, a veia mesentérica foi canulada cuidadosamente para possibilitar a coleta de amostras de sangue em intervalos de tempo predeterminados durante os experimentos de perfusão *in situ*. Além disso, uma abertura na região do pescoço permitiu acessar a veia jugular, a qual foi utilizada como via de acesso para a reposição de sangue durante os experimentos (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

A solução de perfusão isenta de fármaco foi mantida à temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e perfundida no trecho intestinal selecionado para o estudo por um período aproximado de 30 minutos a um fluxo de 0,5 mL/min até a completa remoção do conteúdo luminal (DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013).

Em seguida, a solução de perfusão contendo os fármacos ou os marcadores solubilizados foi perfundida a um fluxo de 0,2 mL/min sob temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os primeiros 60 minutos de perfusão correspondem ao período para atingir o estado de equilíbrio, ou seja, é o período para que o fármaco ou o marcador em solução possa alcançar o equilíbrio com a membrana intestinal (DAHAN et al., 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

As amostras de perfusato foram coletadas em intervalos de 15 minutos por um tempo total de coleta de 120 minutos (coleta aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos). Imediatamente após cada coleta, os recipientes foram pesados para permitir o cálculo da taxa de fluxo de água (TFA) e, em seguida, as amostras foram congeladas a -20°C para posterior análise por método cromatográfico, o qual é descrito no Capítulo 5, item 5.1 (DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

As amostras de sangue foram coletadas aos 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da veia mesentérica canulada. A reposição de sangue foi feita através da veia jugular, com o mesmo volume de sangue coletado a partir da veia mesentérica dos ratos submetidos aos ensaios de perfusão. Após as coletas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos e o plasma obtido foi congelado a -20°C até a realização das análises por método cromatográfico, o qual é descrito no Capítulo 5, item 5.2.

Após a finalização das coletas de perfusato e sangue, o aprofundamento da anestesia em todos os animais foi realizado com a administração intramuscular de uma dose da associação anestésica catamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) para possibilitar a posterior eutanásia com solução saturada de cloreto de potássio por via intracardíaca (AVMA, 2007; DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; LI et al., 2011; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Após a constatação da morte de cada animal, o segmento intestinal utilizado nos experimentos foi retirado para a realização das medições de comprimento (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; REIS et al., 2013).

Cálculos relacionados aos ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

A quantificação de cada fármaco no perfusato permitiu obter o resultado de permeabilidade efetiva (P_{ef}), o qual foi calculado de acordo com a Equação 2.1 (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; ERIKSSON et al., 2010; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; REIS et al., 2013):

$$P_{ef} = - \frac{Q_{entrada}}{A} \times \ln \left(\frac{C_{saída, corrigida}}{C_{entrada}} \right)$$

Equação 2.1

onde: P_{ef} corresponde à permeabilidade efetiva do fármaco ou marcador; $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada da solução de perfusão; A é a área ($2\pi RL$) disponível para a absorção intestinal, considerando o comprimento (L) e o raio do intestino (R); $C_{saída, corrigida}$ corresponde à concentração corrigida do fármaco ou marcador na saída do segmento intestinal e C_{in} é a concentração do fármaco ou marcador na entrada do trecho intestinal.

A partir dos valores de P_{ef} obtidos em ratos por meio do modelo de perfusão *in situ*, foram calculados os valores de P_{ef} preditos para seres humanos por meio da Equação 2.2 descrita por Fagerholm, Johansson e Lennernäs (1996) (DEZANI et al., 2016, 2017; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; SVENSSON et al., 1999):

$$P_{ef, humanos} = 3,6 P_{ef, ratos} + 0,03 \times 10^{-4}$$

Equação 2.2

onde: $P_{ef, humanos}$ corresponde à permeabilidade efetiva predita para seres humanos; $P_{ef, ratos}$ é a permeabilidade efetiva obtida a partir de ensaios em ratos empregando o modelo de perfusão *in situ*.

Da mesma maneira, a fração da dose oral absorvida (F_a) em seres humanos pode ser predita com base na Equação 2.3 sugerida por Sugano e colaboradores (2001) (DEZANI et al., 2016, 2017; ESCRIBANO et al., 2012; JUNIOR et al., 2015; SUGANO et al., 2001a).

$$F_a = 1 - \exp(-38450 \times P_{ef, \text{ ratos}})$$

Equação 2.3

onde: $P_{ef, \text{ ratos}}$ é a permeabilidade efetiva obtida a partir dos ensaios com ratos empregando o modelo de perfusão *in situ*.

Para realizar a correção da taxa de fluxo de água (TFA) sobre a concentração da substância no perfusato, foi utilizado o método gravimétrico (DEZANI et al., 2016; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001). A TFA foi calculada de acordo com a Equação 2.4 apresentada abaixo:

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{saída}}{Q_{entrada}} \right) \right] \frac{Q_{entrada}}{l}$$

Equação 2.4

onde: $Q_{entrada}$ corresponde ao fluxo de entrada da solução de perfusão no interior do segmento intestinal; $Q_{saída}$ é o fluxo de saída da solução de perfusão em um intervalo de tempo predefinido e l é o comprimento do segmento intestinal selecionado para o estudo.

Para as amostras de sangue coletadas a partir da veia mesentérica, foram calculados os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap}) de acordo com a Equação 2.5:

$$P_{ap} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_{doador}}$$

Equação 2.5

onde: Q corresponde à quantidade acumulada do fármaco que aparece no sangue mesentérico em função do tempo t sob a condição de equilíbrio; A é a área de superfície intestinal disponível para a absorção e C_{doador} é a concentração do fármaco ou marcador na solução de perfusão.

Avaliação da permeabilidade intestinal por meio do modelo *in vitro* em MDCK

Os ensaios de permeabilidade *in vitro* foram realizados em culturas celulares MDCK utilizando o intervalo de passagem entre 4 e 10. As monocamadas foram empregadas na realização dos experimentos após 5 dias de crescimento em placas de cultura.

As células foram cultivadas em meio de crescimento constituído de solução modificada de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 10% de SBF e 1% de solução de penicilina e estreptomicina em frascos T-75 (75 cm² de área disponível para o crescimento). O meio foi filtrado assepticamente com o emprego de filtro com 0,22 µm de porosidade.

A confluência de crescimento constatada nos frascos correspondente à 85-95% de área indicou o momento adequado para a transferência das células. As células foram lavadas com PBS e, em seguida, deslocadas da parede dos frascos T-75 com o uso de tripsina 0,05% para a obtenção da suspensão celular, a qual foi utilizada no preparo da próxima passagem (novo frasco T-75) ou na montagem das placas de cultura destinadas aos experimentos de permeabilidade. O crescimento celular e a confluência nas placas de cultura foram monitorados diariamente.

A incubação das placas e dos frascos de cultivo foi realizada em incubadoras de CO₂ (concentração de 5% de CO₂) com condições adequadas de umidade relativa (95%) e temperatura (37±1°C).

Para o preparo das monocamadas celulares, foram utilizadas placas de 6 poços com suportes com filtro permeável (*inserts*). As células foram semeadas na densidade de 2,5 x 10⁶ células/mL no interior dos suportes. O meio de crescimento foi adicionado nos lados apical e basolateral das placas, as quais foram levadas à incubadora de CO₂ para crescimento. A troca de meio foi realizada a cada 24-48 horas.

Após a constatação da confluência ideal das células MDCK nos suportes com filtro permeável, os ensaios de permeabilidade foram realizados no quinto dia do período de crescimento.

O meio de transporte utilizado consistiu de tampão Hanks BSS contendo 25 mM de HEPES e 1% de SBF. A solução foi mantida a 37°C com pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 10 N. Cada fármaco ou marcador foi completamente solubilizado na solução de Hanks a uma concentração de 15 μ M (AZT, d4T e RNT) e de 10 μ M (3TC e METO).

Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e as monocamadas celulares foram verificadas quanto à viabilidade por meio da resistência elétrica transepitelial (TEER) com o uso do equipamento Millicel®-ERS (Millipore Corporation, MA, EUA). A faixa de valores de TEER considerada para o presente estudo foi de 300 a 500 Ω .cm². Além disso, o uso dos marcadores RNT e METO permitiram auxiliar na avaliação da viabilidade da monocamada de MDCK.

Os ensaios de transporte foram realizados bidirecionalmente, ou seja, no sentido apical-basolateral (A→B) e basolateral-apical (B→A). Antes do início dos ensaios, o meio de crescimento celular foi removido e substituído por meio Hanks isento de fármaco (solução branco) para a realização da lavagem das células por 10 minutos a 37°C em incubadora de agitação. Neste intervalo, as placas com 6 poços foram preparadas para os experimentos de permeabilidade. Aos poços destinados aos ensaios A→B, a solução branco foi adicionada no lado basolateral, enquanto que a solução contendo o fármaco foi adicionada no lado apical contendo a monocamada de células. Para os ensaios B→A, a solução branco foi adicionada no lado apical, enquanto que o meio contendo o fármaco foi adicionado no lado basolateral.

O início dos ensaios foi considerado a partir da adição das soluções contendo o fármaco ou o marcador nos compartimentos doadores (apical para estudos A→B e basolateral para estudos B→A). O sistema foi incubado a 37°C em incubadora com agitação. As amostras foram coletadas (200 μ L) aos 30, 60 e 90 minutos a partir do compartimento receptor com reposição de meio isento de fármaco a 37°C. Ao final das coletas, as soluções doadoras de cada poço foram também coletadas para quantificação da concentração do fármaco no compartimento doador. A Figura 2.1 apresenta esquematicamente o desenho experimental empregado no presente estudo.

Figura 2.1: Representação esquemática do desenho experimental empregado nos estudos de permeabilidade em modelo *in vitro* MDCK

Após todas as coletas, as células foram imediatamente lavadas com solução salina gelada e submetidas à secagem por uma noite em temperatura ambiente. Após este período, cada membrana de células foi removida dos suportes com filtro permeável e colocada em frascos de vidro. Adicionou-se 1 mL de solução de acetonitrila:água (25:75%) e as preparações foram levadas ao banho ultrassônico por 15 minutos. A solução resultante foi transferida para tubos cônicos de microcentrifuga e congelados a -20°C até a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), cujo método está descrito no Capítulo 5, item 5.3.

Cálculo da permeabilidade aparente (P_{ap}) e porcentagem de recuperação

Os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap} , expressos em cm/s) foram calculados por meio da Equação 2.6 indicada abaixo:

$$P_{ap} = \frac{\frac{dC}{dt} \times V_r}{A \times C_0}$$

Equação 2.6

onde: dC/dt corresponde à concentração acumulada no compartimento receptor em função do tempo t ; V_r é o volume do compartimento receptor em cm^3 ; V_d é o volume do compartimento doador em cm^3 ; A é a área da monocamada celular disponível para a absorção e; C_0 corresponde à concentração inicial da solução doadora.

A porcentagem de recuperação (%) foi calculada de acordo com a Equação 2.7:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{\sum_{30}^{90} C_i \times 0,2 + V_r \times C_{r,final} + V_d \times C_{d,final}}{V_d \times C_0} \right) \times 100$$

Equação 2.7

onde: V_r é o volume do compartimento receptor em cm^3 ; V_d é o volume do compartimento doador em cm^3 ; C_i é a concentração da amostra no tempo t ; C_0 é a concentração inicial; $C_{r, final}$ é a concentração acumulada do fármaco no compartimento receptor ao final do experimento e; $C_{d, final}$ é a concentração do fármaco no compartimento doador ao final do experimento.

Análise estatística dos resultados

Os resultados de P_{ef} e de P_{ap} obtidos por meio dos modelos de perfusão *in situ* e os resultados de P_{ap} obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK foram comparados estatisticamente por meio da ANOVA (análise de variância) e teste de

Tukey. Os valores foram considerados estatisticamente significantivos quando $p < 0,05$ (DEZANI et al., 2013, 2016; REIS et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliação da permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

Devido à constante movimentação de água (absorção e secreção) no interior do segmento intestinal submetido ao estudo de perfusão *in situ*, a correção da TFA foi considerada nos cálculos prévios antes da determinação da P_{ef} e da P_{ap} dos fármaco estudados. Este procedimento é de suma importância, uma vez que, quando não considerado, reflete a quantificação incorreta do fármaco ou do marcador contido nas amostras de perfusato. Em outras palavras, a substância no interior do intestino pode estar concentrada ou diluída em função da absorção ou secreção de água através da parede do TGI. Para a correção do TFA, o método gravimétrico foi empregado e os resultados para cada composto são mostrados na Tabela 2.1 (DEZANI et al., 2016, 2017; LUO et al., 2013; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Tabela 2.1: Resultados referentes às TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos para cada fármaco ou marcador empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico (n=6).

Rato	RNT	METO	d4T	3TC	AZT
1	2,00	0,00	-0,99	-2,11	0,00
2	-1,00	1,00	0,00	-0,83	-1,05
3	-3,00	2,35	1,82	-0,95	-1,90
4	4,00	3,00	0,95	0,00	-1,65
5	1,00	1,05	0,83	2,94	0,00
6	-1,00	2,00	0,00	0,00	-1,05

Conforme apresentado na Tabela 2.1, os valores de TFA obtidos indicaram o comportamento de absorção ou secreção de água que ocorre no lúmen intestinal durante a execução dos experimentos. Assim, os valores negativos indicam que houve secreção de água no lúmen intestinal e, portanto, diluição da concentração do fármaco no perfusato. Ao contrário, valores positivos indicam que houve

absorção de água e, portanto, concentração do fármaco no lúmen intestinal (DEZANI et al., 2013, 2016; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

O método gravimétrico descrito por Sutton, Rinaldi e Vukovinsky (2001) foi adotado no presente estudo devido sua vantagem de evitar a coperfusão de uma substância não absorvível, tal como o vermelho de fenol, inulina e ^{14}C -PEG-4000 comumente utilizados nos estudos de perfusão *in situ*, os quais poderão causar interferências nos estudos de permeabilidade de fármacos (DEZANI et al., 2016; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Por tratar-se de uma ocorrência fisiologicamente dinâmica, os valores de TFA podem variar constantemente durante o experimento, dependendo de vários fatores, tais como: tipo de composto avaliado, conteúdo luminal, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão. Em estudo de perfusão *in situ* realizado por Zakeri-Milani e colaboradores (2007), os valores de TFA descritos para a região do jejuno proximal variaram de -318,40 a 90,0 $\mu\text{L/h/cm}$ (DEZANI et al., 2017; ZAKERI-MILANI et al., 2007).

Determinação da P_{ef} e da P_{ap} dos marcadores METO e RNT

Previamente aos estudos de permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais, foram realizados experimentos com os marcadores de alta e de baixa permeabilidade (METO e RNT, respectivamente) com o propósito de verificar a viabilidade dos segmentos intestinais nos ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. Os resultados de P_{ef} e de P_{ap} das substâncias marcadoras são apresentadas na Tabela 2.2, bem como os valores reportados na literatura.

Tabela 2.2: Resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT (n=6) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* e valores de permeabilidade descritos na literatura para os referidos marcadores.

	Modelo	METO $P_{ef} \pm DP \times 10^{-5}$ cm/s	METO $P_{ap} \pm DP \times 10^{-5}$ cm/s	RNT $P_{ef} \pm DP \times 10^{-5}$ cm/s	RNT $P_{ap} \pm DP \times 10^{-5}$ cm/s
Resultados obtidos no presente trabalho	Perfusão <i>in situ</i> em rato com coleta de sangue mesentérico	5,63±0,47	0,55±0,049	1,94±0,17	0,17±0,020
Resultados descritos na literatura	Perfusão <i>in situ</i> em ratos (P_{ef})	1,70 ⁽¹⁾ 3,30 ^(2,19) 1,47 ⁽³⁾ 15,21 ⁽⁴⁾ 5,90 ⁽⁵⁾ 5,32 ⁽⁶⁾	3,20 ⁽¹⁵⁾	2,2 ⁽²⁾ 1,75 ⁽¹⁷⁾ 0,73 ⁽¹⁸⁾	—
	Perfusão <i>in situ</i> em seres humanos (P_{ef})	13,40 ⁽⁷⁾ 15,00 ⁽⁸⁾	—	2,73 ⁽¹⁶⁾	—
	<i>Ex vivo</i> em câmaras de difusão (P_{ap})	79,9 ⁽⁹⁾ 3,50 ⁽⁸⁾ 2,40 ⁽¹⁰⁾	—	1,5 ⁽¹²⁾	—
	<i>In vitro</i> em Caco-2 (P_{ap})	3,40 ⁽¹¹⁾	—	0,21 ⁽¹³⁾	—
	<i>In vitro</i> em PAMPA (P_{ap})	0,04 ⁽²⁰⁾	—	0,46 ⁽¹⁴⁾	—

(1)(DAHAN; AMIDON, 2009a); (2)(ZAKERI-MILANI et al., 2009); (3)(DAHAN; WEST; AMIDON, 2009); (4)(MASAOKA et al., 2006); (5)(SALPHATI et al., 2001); (6)(DEZANI et al., 2016); (7)(LENNERNÄS, 2007); (8)(LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997); (9)(DEZANI et al., 2013); (10)(WATANABE; TAKAHASHI; HAYASHI, 2004); (11)(UCHIDA et al., 2009); (12)(COLLETT et al., 1999); (13)(BOURDET; POLLACK; THAKKER, 2006); (14)(REIS et al., 2013); (15) (MOLS et al., 2009); (16)(TAKAMATSU et al., 2001); (17)(ESCRIBANO et al., 2012); (18)(KIM et al., 2006); (19)(INCECAYIR; TSUME; AMIDON, 2013); (20) (CHEN et al., 2008).

Conforme indicado na Tabela 2.2, o METO apresentou valores maiores de P_{ef} em comparação com a RNT em diferentes modelos, embora resultados de P_{ap} não tenham sido facilmente encontrados na literatura para ambos os marcadores. Entretanto, em ensaios de perfusão *in situ* em ratos descritos por Dahan e Amidon (2009) e por Dahan, West e Amidon (2009), os valores de P_{ef} do METO reportados encontram-se abaixo dos valores de P_{ef} da RNT da literatura, ficando até mesmo abaixo do resultado de P_{ef} da RNT obtido por meio dos ensaios descritos no presente trabalho, apesar das semelhanças nas condições experimentais empregadas. Tais constatações podem estar relacionadas a algumas diferenças técnicas, tais como: composição da solução de perfusão, faixa de peso dos animais utilizados, tamanho amostral considerado ($n=4$) e emprego do vermelho de fenol como marcador não absorvível (DAHAN; AMIDON, 2009a; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

A possível influência de um componente presente na solução de perfusão vem sendo discutida em trabalhos já publicados, uma vez que o uso de tal composto pode, imprevisivelmente, interferir de alguma maneira na dinâmica de transporte de um fármaco em estudo, o que pode resultar em divergências de resultados de permeabilidade. Além disso, o protocolo experimental adotado por Dahan e Amidon descreve que o METO foi co-perfundido com os outros fármacos estudados, o que pode, também, explicar a diferença encontrada nos valores de P_{ef} apresentados na Tabela 2.2 (DAHAN; AMIDON, 2009a; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2017; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Ainda com relação aos valores de METO, algumas divergências podem ser encontradas quando comparações entre os modelos são realizadas, o que não é devidamente adequado, uma vez que cada método apresenta vantagens e limitações próprias. De acordo com a Tabela 2.2, os valores de permeabilidade apresentados para o modelo PAMPA apresentaram-se significativamente desiguais entre METO e RNT. Devido a inúmeras variáveis possíveis que podem estar envolvidas neste modelo, é provável encontrar, de fato, resultados divergentes (REIS et al., 2013). Por outro lado, os valores de P_{ef} do METO obtidos no presente trabalho e os resultados publicados por Salphati e colaboradores (2001) e Dezani e colaboradores (2016) apresentaram-se muito próximos (Tabela 2.2).

Outros resultados de METO descritos por diferentes grupos de pesquisa, como Zakeri-Milani e colaboradores (2009), Lennernäs, Nylander e Ungell (1997),

Watanabe, Takahashi e Hayashy (2004) e Uchida e colaboradores (2012), foram semelhantes entre eles. Além disso, os resultados publicados referentes aos estudos de perfusão *in situ* em seres humanos foram elevados em relação aos diferentes modelos apresentados na Tabela 2.2, o que evidencia a teoria de que as diferenças entre as espécies podem fornecer resultados variados (DEZANI et al., 2016; LENNERNÄS, 2007; LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997).

Com relação ao modelo *ex vivo*, um elevado valor de permeabilidade aparente descrito por Dezani e colaboradores (2013) pode ser observado para o METO na Tabela 2.2 ($79,9 \times 10^{-5}$ cm/s). Neste estudo, as condições empregadas durante a execução dos experimentos podem justificar o resultado encontrado por tais autores (DEZANI et al., 2013).

Os valores de P_{ap} obtidos no presente trabalho (Tabela 2.2) seguiram a mesma tendência mostrada nos resultados referentes à P_{ef} . Em outras palavras, o METO é aproximadamente três vezes mais permeável que a RNT, o que sugere que esse marcador foi prontamente transportado para a circulação sanguínea mesentérica. Esta observação corrobora com as características já conhecidas de ambos os marcadores, ou seja, o METO apresenta como mecanismo de transporte a via passiva transcelular e sua F_a é em torno de 95%, enquanto a RNT apresenta como principal mecanismo a via passiva paracelular e baixa F_a (50%), o que justifica sua permeabilidade limitada em função da área disponível para absorção (de 0,01 a 0,1%) em comparação com a área total do intestino delgado (ANTUNES et al., 2013; KORTEJÄRVI et al., 2005; LOPES et al., 2014).

Em relação aos resultados de P_{ef} da RNT (Tabela 2.2), a semelhança entre o valor obtido no presente estudo e os valores apresentados por Zakeri-Milani e colaboradores (2009) e Collett e colaboradores (1999) indica a similaridade entre as técnicas realizadas, uma vez que a via paracelular é adequada em segmentos intestinais. Por outro lado, este marcador exibiu valores mais baixos em modelos como Caco-2 e PAMPA, os quais apresentam como uma das limitações a ausência de transporte passivo por via paracelular, o que justifica os baixos valores de P_{ef} descritos na Tabela 2.2 (BOURDET; POLLACK; THAKKER, 2006; REIS et al., 2013).

Dessa maneira, os resultados obtidos mostraram que o modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico é adequado para diferenciar as características de alta e de baixa permeabilidade de substâncias. Uma vez

definidas as condições do ensaio em função dos resultados obtidos para os marcadores, procedeu-se o estudo com os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT.

Determinação da P_{ef} e da P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e predição da absorção oral em seres humanos

A permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foi avaliada por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. A Tabela 2.3 apresenta os resultados de P_{ef} e de P_{ap} para cada um dos compostos estudados.

Tabela 2.3: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico para os fármacos d4T, 3TC e AZT, bem como para os marcadores METO e RNT (n=6).

Fármaco/marcador	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5}$ (cm/s)	$P_{ap} \pm SD \times 10^{-5}$ (cm/s)
METO	5,63 $\pm$ 0,47	0,55 $\pm$ 0,049
RNT	1,94 $\pm$ 0,17	0,17 $\pm$ 0,020
d4T	4,18 $\pm$ 0,34	0,49 $\pm$ 0,074
3TC	3,16 $\pm$ 0,90	0,23 $\pm$ 0,050
AZT	4,37 $\pm$ 0,45	0,50 $\pm$ 0,031

Os resultados apresentados na Tabela 2.3 permitiram construir os gráficos correspondentes a cada valor com seu respectivo desvio padrão. Assim, a Figura 2.2 e Figura 2.3 representam graficamente os valores de P_{ef} e de P_{ap} , respectivamente.

Figura 2.2: Perfis de P_{ef} obtidos para os fármacos e marcadores empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico (n=6).

* $p < 0,05$ em comparação com a RNT e ** $p < 0,05$ em comparação com o METO.

Figura 2.3: Perfis de P_{ap} obtidos para os fármacos e marcadores empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico (n=6).

* $p < 0,05$ em comparação com a RNT e ** $p < 0,05$ em comparação com o METO.

Conforme apresentado na Tabela 2.3 e nas Figura 2.2 e Figura 2.3, os resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais apresentaram o mesmo perfil gráfico. A análise estatística demonstrou que tanto a d4T quanto a AZT mostraram-se altamente permeáveis, assim como o marcador METO, sendo estas três substâncias diferentes da RNT. Por outro lado, a 3TC apresentou-se diferente do METO, mas não diferente da RNT. Ainda, o valor de P_{ap} da 3TC se distancia mais dos valores de P_{ap} da d4T e da AZT, o que pode sugerir a interação do referido fármaco com carreadores presentes nas membranas dos enterócitos, diminuindo o seu aparecimento no sangue mesentérico.

Como a 3TC não apresentou resultado semelhante ao METO, esse fármaco seria classificado como pouco permeável, uma vez que a diferença estatística entre a 3TC e a RNT não foi constatada. Logo, seu transporte é limitado e o mecanismo envolvido pode estar relacionado aos carreadores de efluxo, não sendo descartada a via paracelular.

A análise estatística dos resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT indicaram que tais substâncias são estatisticamente diferentes com $p < 0,05$, o que confirmou a adequabilidade dos procedimentos experimentais empregados no presente estudo (Figura 2.2 e Figura 2.3).

Poucos estudos descritos na literatura discutem a classificação de permeabilidade de fármacos em modelos de perfusão *in situ*. Zakeri-Milani e colaboradores (2005) mencionam valores limítrofes para tal classificação, onde fármacos com P_{ef} menor que 2×10^{-5} cm/s seriam considerados como sendo de baixa permeabilidade e fármacos com P_{ef} maior que 3×10^{-5} cm/s seriam considerados como sendo de alta permeabilidade (DEZANI et al., 2016; ZAKERI-MILANI et al., 2005). Entretanto, uma vez que o SCB considera apenas as denominações *alta* e *baixa* para designar a permeabilidade de um composto, o termo *permeabilidade moderada*, apresentada em alguns trabalhos publicados, não é considerado adequado.

O modelo de perfusão *in situ* é amplamente descrito na literatura para diferentes fármacos. Entretanto, poucos são os estudos publicados em relação às substâncias marcadoras, bem como aos antirretrovirais do presente estudo. A Tabela 2.4 apresenta os valores de P_{ef} e de P_{ap} obtidos no presente estudo e os valores de permeabilidade reportados na literatura referentes ao METO, RNT, d4T, 3TC e AZT.

Tabela 2.4: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} obtidos para cada substância empregada no presente estudo e valores adquiridos da literatura por meio de diferentes modelos.

	d4T	3TC	AZT
Resultados obtidos no presente estudo			
$P_{ef} \times 10^{-5}$ (cm/s)	4,18	3,16	4,37
$P_{ap} \times 10^{-5}$ (cm/s)	0,49	0,23	0,50
Dados de permeabilidade reportados na literatura ($\times 10^{-5}$)			
Perfusão <i>in situ</i> em ratos (P_{ef} , cm/s)	3,96 ⁽⁵⁾	3,08 ⁽⁵⁾	4,17 ⁽⁵⁾
Modelo <i>in vitro</i> Caco-2 (P_{ap} , cm/s)	0,45 ⁽¹⁾	0,10 ⁽²⁾	6,14 ⁽²⁾ 2,16 ⁽⁴⁾
Modelo <i>ex vivo</i> com câmaras de difusão verticais (P_{ap} , cm/s)		45,8 ⁽³⁾	53,4 ⁽³⁾

(1) (SICCARDI et al., 2003); (2) (DE SOUZA et al., 2009); (3) (DEZANI et al., 2013); (4) (YU; SINKO, 1997); (5) (DEZANI et al., 2016).

A análise da Tabela 2.4 permite observar as diferenças entre os resultados de P_{ef} obtidos no presente estudo e os valores de permeabilidade descritos na literatura. No entanto, o modelo de perfusão *in situ* utilizado para o estudo de fármacos antirretrovirais nos ensaios conduzidos por Dezani e colaboradores (2016) forneceu resultados mais próximos aos obtidos neste trabalho. As condições experimentais adotadas nos dois estudos (no presente estudo e nos estudos conduzidos por Dezani e colaboradores) foram as mesmas. Essa observação indica a reprodutibilidade do método utilizado para os estudos de permeabilidade intestinal de substâncias.

Com relação aos demais resultados de permeabilidade apresentados por outros autores, não foi possível encontrar semelhanças entre os dados (Tabela 2.4). Ainda assim, os valores reportados da AZT foram ligeiramente mais próximos dos resultados encontrados no presente trabalho. As diferenças observadas podem ser atribuídas ao tipo de método escolhido, às particularidades de cada uma das técnicas empregadas e às condições experimentais.

Ainda de acordo com a Tabela 2.4, a P_{ef} da d4T obtida no presente estudo foi de $4,18 \times 10^{-5}$ cm/s. Este valor difere daquele obtido por Siccardi e colaboradores (2003) que empregaram o modelo *in vitro* com células Caco-2 ($0,45 \times 10^{-5}$ cm/s) (SICCARDI et al., 2003). Com relação à 3TC, a P_{ef} foi igual a $3,16 \times 10^{-5}$ cm/s no presente estudo, sendo este dado também diferente em relação àqueles descritos na literatura e obtidos por meio de modelos como células Caco-2 ($0,10 \times 10^{-5}$ cm/s) (DE SOUZA et al., 2009) e método *ex vivo* com tecido intestinal isolado ($45,80 \times 10^{-5}$ cm/s) (DEZANI et al., 2013). O fármaco AZT, por sua vez, apresentou resultados de P_{ef} igual a $4,37 \times 10^{-5}$ cm/s. Este valor aproxima-se do resultado obtido por Souza e colaboradores (2009) utilizando células Caco-2, porém é importante ressaltar que tal método *in vitro* difere consideravelmente do método de perfusão *in situ* descrito no presente trabalho. As divergências podem estar relacionadas a diversos fatores como o modelo utilizado para o estudo de permeabilidade e as condições dos ensaios.

A comparação entre resultados de permeabilidade obtidos através de modelos que buscam mimetizar as condições *in vivo* (tais como modelos *in situ*, *ex vivo* e *in vivo*) e resultados de permeabilidade obtidos através de modelos mais simples (modelos *in vitro* como Caco-2 e PAMPA) indicam o possível envolvimento de outros fatores interferentes nos processos de permeabilidade, como o envolvimento de carreadores de e/ou de enzimas metabolizadoras presentes nos enterócitos. Considerando que a via transcelular passiva é a principal rota de permeação de substâncias, espera-se uma correlação razoável entre os diferentes modelos, sobretudo quando os compostos estudados apresentam alta permeabilidade.

Porém, quando divergências de resultados são observadas, é importante considerar, além das condições experimentais empregadas, outros fatores. Os modelos *in vitro* Caco-2 e PAMPA apresentam significativas desvantagens em comparação com o modelo de perfusão *in situ* apresentado neste trabalho. É importante destacar as vantagens deste modelo, tais como: preservação do suprimento sanguíneo e inervação, condições fisiológicas mantidas, transportadores e enzimas ativos. Já os métodos *in vitro* em PAMPA permitem apenas o estudo de permeação de substâncias transportadas passivamente, não possibilitando o estudo da influência de outros mecanismos como a via paracelular, atuação de transportadores e influência de enzimas. O método que utiliza células

Caco-2 apresenta desvantagens como: ausência de fatores fisiológicos (suprimento sanguíneo e inervação), ausência de muco, inadequada expressão de enzimas e transportadores de efluxo e influxo, junções intercelulares irregulares, manutenção da viabilidade celular dificultada, condições dos ensaios (composição do tampão utilizado, pH da solução e uso de cossolventes). Além disso, a idade celular influencia nos resultados de permeabilidade obtidos através deste modelo (DEZANI et al., 2017; JUNIOR et al., 2015).

Um importante fator a ser considerado é a existência da CAE (camada de água estacionária), a qual corresponde a uma camada de água, muco e glicocálice mais ou menos estática adjacente à parede da membrana e é formada pela mistura incompleta do conteúdo luminal situado próximo à superfície da mucosa intestinal e que atua como importante barreira à absorção (AVDEEF, 2003; FAGERHOLM; LENNERNÄS, 1995; THOMSON et al., 1983). Os métodos *in vitro* e *ex vivo* apresentam a CAE mais espessa em comparação à condição *in vivo*, podendo ser alterada de acordo com o tipo e velocidade de agitação utilizada. No modelo de perfusão *in situ*, a CAE (bem como a integridade da membrana) é preservada respeitando os limites do fluxo da solução de perfusão no intestino (0,1 a 0,3 mL/min) (SUGANO et al., 2001b). Assim, a permeabilidade de um composto obtida por meio do modelo de perfusão *in situ* indica o comportamento de um fármaco, uma vez que as condições oferecidas pelo modelo fornecem características semelhantes às condições *in vivo*.

Desta forma, é importante investigar quais os mecanismos participantes dos processos de permeabilidade dos fármacos antirretrovirais, tais como influência de transportadores e de enzimas presentes nos enterócitos. Até o momento, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos na permeabilidade dos compostos estudados neste trabalho. Deste modo, diferentes resultados de permeabilidade podem indicar diferenças nos mecanismos envolvidos no transporte de fármacos e dos marcadores (PRETORIUS; BOUIC, 2009; QUEVEDO; BRIÑÓN, 2009).

A partir dos resultados de P_{ef} obtidos em ratos por meio do modelo de perfusão *in situ*, foi possível prever a P_{ef} e a F_a em seres humanos a partir da aplicação das Equação 2.2 e Equação 2.3. A Tabela 2.5 apresenta os valores preditos para cada um dos fármacos antirretrovirais e para cada marcador empregados nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. A Figura 2.4 representa graficamente a

comparação entre os valores de P_{ef} obtidos em ratos e os valores de P_{ef} e F_a preditos para seres humanos.

Tabela 2.5: Valores preditos de P_{ef} e de F_a para seres humanos calculados a partir dos resultados obtidos de P_{ef} por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos e valores de F_a reportados na literatura.

Fármaco/ Marcador	$P_{ef} \times 10^{-5}$ (cm/s) predita para seres humanos	F_a (%) predita para seres humanos	F_a (%) reportada na literatura
METO	20,6	88	95 ⁽¹⁻⁵⁾
RNT	7,3	53	50 ^(4,5)
d4T	15,3	80	86 ⁽⁶⁾
3TC	11,7	70	80 ⁽⁷⁾
AZT	16,0	81	98 ⁽¹⁾

(1) (ZHU et al., 2002); (2) (DANELIAN et al., 2000); (3) (BALIMANE; CHONG, 2008); (4) (IRVINE et al., 1999); (5) (SUGANO et al., 2001b); (6) (SY et al., 2015); (7) (SABO et al., 2002).

De acordo com a Tabela 2.5, os valores de F_a preditos para METO, RNT, d4T e 3TC são próximos aos valores reportados na literatura. Resultados de F_a para os antirretrovirais são mais raros de serem encontrados. Entretanto, os valores preditos se aproximam daqueles reportados em trabalhos encontrados na literatura, exceto para a zidovudina. Uma vez que os resultados preditos são baseados nos valores encontrados em ratos, algumas diferenças interespecíficas podem ser notadas quando do uso de modelos matemáticos. No entanto, estudos com maior número de fármacos pode auxiliar no aprimoramento de tais equações com o objetivo de obter resultados mais próximos das condições *in vivo*.

Os valores de F_a preditos para seres humanos demonstram a proximidade de valores entre os antirretrovirais e o METO (Tabela 2.5). No entanto, a RNT apresentou o menor valor de F_a em relação às outras substâncias. Tais resultados concordam com os relatos na literatura em relação aos valores de F_a destes compostos.

Figura 2.4: Representação gráfica comparativa entre os valores de P_{ef} obtidos em ratos por meio do modelo de perfusão *in situ* e os valores de P_{ef} e F_a preditos para seres humanos.

De acordo com a Figura 2.4, a análise dos resultados mostrou que o METO apresentou o maior valor de P_{ef} e de P_{ap} em comparação com as demais substâncias, enquanto que a RNT apresentou os menores valores. Os resultados referentes aos fármacos antirretrovirais estiveram entre os valores dos dois marcadores empregados no presente trabalho.

Em estudo conduzido por Dezani e colaboradores (2016), os valores de P_{ef} e de F_a são semelhantes aos resultados obtidos no presente estudo ($19,45 \times 10^{-5}$ cm/s e 87,2% para o METO; $14,56 \times 10^{-5}$ cm/s e 78,2% para a d4T; $11,39 \times 10^{-5}$ cm/s e 69,4% para a 3TC e de $15,31 \times 10^{-5}$ cm/s e 79,9% para a AZT, respectivamente). Esta comparação indica as semelhanças entre os experimentos realizados por Dezani e colaboradores e os ensaios descritos no presente estudo (DEZANI et al., 2016).

Com relação à predição da permeabilidade em seres humanos, alguns estudos têm relatado os valores de P_{ef} obtidos para o METO a partir dos ensaios de perfusão *in situ* em seres humanos, sendo eles: $15,0 \times 10^{-5}$ cm/s (LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997), $13,4 \times 10^{-5}$ cm/s (LENNERNÄS, 2007) e $19,4 \times 10^{-5}$ cm/s (DEZANI et al., 2016). Conforme apresentado na Figura 2.5, o valor preditivo de P_{ef} em seres humanos para o METO a partir do resultado obtido no presente estudo foi de $20,6 \times 10^{-5}$ cm/s, sendo um valor próximo ao relatado na literatura

(DEZANI et al., 2016; LENNERNÄS; NYLANDER; UNGELL, 1997). Por se tratar de uma predição calculada da P_{ef} em seres humanos através da P_{ef} obtida em ratos, é importante considerar algumas diferenças nos resultados em razão das condições adotadas nos estudos em ratos e em seres humanos, além das diferenças referentes à espécie.

A possibilidade de prever a P_{ef} em seres humanos a partir de ensaios de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos permite estudar o comportamento de fármacos mediante condições próximas às situações *in vivo*. Assim, o uso de animais em estudos de permeabilidade, além de permitir a boa correlação de dados, torna-se importante para estudos como novas moléculas/medicamentos, com o intuito de, cada vez mais, diminuir os estudos em seres humanos, reduzindo custos e diminuindo a exposição de voluntários sadios em estudos de biodisponibilidade e/ou bioequivalência. Desta maneira, o aprimoramento de métodos utilizados nos estudos de permeabilidade permite fortalecer os princípios de bioisenção propostos pelas agências reguladoras como FDA e EMA.

Embora os valores de P_{ef} e de P_{ap} correspondam à permeabilidade do fármaco, a comparação destes dois parâmetros não é completamente adequada. Os resultados de permeabilidade obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* fornecem dados de P_{ef} , enquanto que variados métodos descritos na literatura fornecem resultados de P_{ap} . Ainda, a comparação entre diferentes métodos, embora os resultados sejam expressos da mesma forma, é dificultada devido às diferentes condições e particularidades apresentadas por diferentes modelos (DEZANI et al., 2016).

Os conceitos de P_{ap} e de P_{ef} ainda não são consolidados na literatura, o que causa confusão e divergência de discussões entre estudos publicados. No caso dos métodos *in vitro* e *ex vivo*, a permeabilidade é normalmente expressa na forma de velocidade de permeação em cm/s conhecida como permeabilidade aparente (P_{ap}). Nestes casos, as amostras são coletadas a partir do compartimento receptor e não é considerada a retenção do fármaco na membrana e outros fatores fisiológicos, pois o equilíbrio se estabelece entre os compartimentos e a membrana biológica submetida ao estudo. Em ensaios que empregam o modelo de perfusão *in situ*, a permeabilidade também é expressa na forma de velocidade de permeação em cm/s, conhecida como permeabilidade efetiva (P_{ef}). Neste caso, todavia,

considera-se a retenção do fármaco na membrana e também são observados outros fatores que influenciam na permeabilidade, como proteínas séricas e outras barreiras. A P_{ef} é derivada da lei de Fick que define a relação entre o fluxo de água através da parede da membrana e a queda na concentração do fármaco através da superfície da membrana, com a finalidade de atingir uma condição de equilíbrio (AVDEEF, 2003; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2008).

Apesar da utilização dos diferentes modelos nos estudos de permeabilidade de fármacos, é possível ter uma ideia do comportamento da substância *in vivo*. No entanto, devido à deficiência de protocolos mais precisos e robustos, a predição da absorção em seres humanos torna-se uma tarefa desafiadora. Muitas vezes, os resultados de permeabilidade obtidos, independente do modelo empregado, exigem a comparação com dados obtidos *in vivo*, ou seja, dados de biodisponibilidade e F_a são frequentemente utilizados para a previsão do comportamento de um fármaco em seres humanos em conjunto com os dados de permeabilidade. Assim, correlacionando estes resultados com os dados de F_a , nem sempre é possível observar boa correlação. Isso pode estar relacionado ao possível envolvimento de transportadores e/ou enzimas nos processos absorptivos, principalmente para substâncias que apresentam mais de um mecanismo de permeação ou quando estas são substratos de enzimas metabolizadoras.

Com base nas discussões levantadas anteriormente, o modelo de perfusão *in situ* oferece grandes vantagens sobre os demais modelos. A existência das condições fisiológicas, incluindo o suprimento sanguíneo e inervação, presença de enzimas metabolizadoras, além da expressão biorrelevante de proteínas carreadoras (efluxo e influxo), faz deste modelo o mais próximo das condições *in vivo*. Tais condições permitem que esta técnica possa ser empregada nos estudos de mecanismos de transporte de diferentes fármacos (DEZANI et al., 2016; STAPPAERTS et al., 2015).

Assim, a padronização das condições nos diferentes modelos para o estudo de permeabilidade é necessária para minimizar as possíveis interferências, uma vez que, até o momento, nenhum modelo utilizado de forma isolada é capaz de caracterizar fármacos quanto aos seus mecanismos de permeação. Daí a importância ressaltada em relação à padronização dos modelos utilizados para o estudo de permeabilidade, com o intuito de reduzir as variações interlaboratoriais, tornando os resultados mais precisos e condizentes.

Diante do que foi apresentado, nas condições experimentais adotadas no presente trabalho, tanto a d4T como a AZT apresentam valores de P_{ef} e de P_{ap} mais próximos dos valores observados para o marcador de alta permeabilidade (METO). A 3TC apresenta-se ligeiramente mais distante do valor do METO. Ainda, a d4T e a AZT apresentam-se distantes dos valores do marcador de baixa permeabilidade (RNT), o que não foi observado para a 3TC. Os resultados de P_{ef} obtidos em ratos podem, portanto, permitir a previsão do comportamento do fármaco em seres humanos.

Estudo de permeabilidade por meio do modelo *in vitro* em MDCK

Os estudos de permeabilidade intestinal em modelo *in vitro* com o emprego de células MDCK foram realizados no sentido apical-basolateral ($A \rightarrow B$) para todos os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT.

A Tabela 2.6 apresenta os valores de P_{ap} obtidos para os experimentos de permeabilidade realizados em modelos celulares MDCK realizados bidirecionalmente ($A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$). As Figura 2.5 e Figura 2.6 apresentam graficamente os valores de P_{ap} obtidos para cada substância.

Tabela 2.6: Resultados de P_{ap} e seus respectivos valores de desvios padrão (DP) para os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT (n=3) obtidos na direção $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$.

Fármaco/marcador	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$
	$A \rightarrow B$	$B \rightarrow A$
METO	1,06±0,130	0,60±0,098
RNT	0,03±0,005	0,04±0,005
d4T	0,06±0,004	0,08±0,007
3TC	0,03±0,003	0,08±0,013
AZT	0,16±0,015	0,16±0,008

Figura 2.5: Representação gráfica dos resultados de P_{ap} obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK para os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT ($n=3$) na direção $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$. A análise estatística foi realizada entre as condições $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ ($p < 0,05$ em comparação com a condição $A \rightarrow B$ para cada substância).

Figura 2.6: Representação gráfica e comparação estatística dos resultados de P_{ap} obtidos por meio do modelo *in vitro* MDCK para os fármacos d4T, 3TC e AZT e para os marcadores METO e RNT nas direções A→B e B→A (* resultados $p < 0,05$ em comparação com o METO; ** resultados $p < 0,05$ em comparação com a RNT).

Conforme apresentado na Tabela 2.6 e na Figura 2.5 e Figura 2.6, os resultados de P_{ap} referentes aos ensaios de permeabilidade em MDCK mostram a alta capacidade de permeação do METO tanto no sentido A→B quanto no sentido B→A. Já as substâncias RNT e AZT apresentaram valores de P_{ap} semelhantes

estatisticamente entre os sentidos $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$, o que sugere que a permeabilidade de tais substâncias não sofreu interferência entre os lados doador e receptor nos ensaios descritos no presente trabalho. Em contrapartida, tanto a d4T quanto a 3TC sofreram diferenças significativas nos valores de P_{ap} quando os estudos $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ foram realizados. Tais diferenças podem estar relacionadas às interações entre fármaco-carreador quanto às próprias características das membranas que compõem os lados apical e basolateral.

Estudos de permeabilidade conduzidos em modelos MDCK para os fármacos antirretrovirais são difíceis de serem encontrados na literatura. Entretanto, um estudo conduzido por Souza e colaboradores (2009) demonstrou que a AZT apresentou resultado de P_{ap} igual a $0,43 \times 10^{-5}$ cm/s no sentido $A \rightarrow B$ e igual a $0,35 \times 10^{-5}$ cm/s no sentido $B \rightarrow A$. Já a 3TC apresentou resultado de P_{ap} igual a $0,54 \times 10^{-5}$ cm/s no sentido $A \rightarrow B$ e igual a $2,71 \times 10^{-5}$ cm/s no sentido $B \rightarrow A$. Tais valores permitiram sugerir a interação entre a lamivudina e carreadores presentes nas células MDCK, embora estas não apresentem carreadores possíveis de serem identificados neste tipo de ensaio. Desta forma, Souza e colaboradores concluíram, com base em estudos complementares, que tanto a 3TC quanto a AZT apresentam-se como fracos substratos de carreador de efluxo (DE SOUZA et al., 2009).

As diferenças nos resultados de P_{ap} nas direções $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ da d4T, conforme apresentado na Tabela 2.6, podem estar relacionadas aos mecanismos de transporte ativo mediado por carreadores N2 e possivelmente N3, além da possível ocorrência de absorção por via facilitada (BALIMANE; SINKO, 1999; SILVA et al., 2012; WACLAWSKI; SINKO, 1996), o que pode explicar as diferenças nos resultados obtidos no presente estudo em ambas as direções.

Diferenças constatadas nos resultados podem estar relacionadas às características da linhagem celular. Segundo Giacomini e colaboradores (2010), diferentes tipos de transportadores estão presentes em células renais, tanto na face apical quanto na basolateral. Além disso, é importante lembrar que tais células estão envolvidas nos processos de eliminação de fármacos por via renal (GIACOMINI et al., 2010).

A comparação de todos os resultados de P_{ap} $A \rightarrow B$ e resultados de P_{ap} $B \rightarrow A$ dos antirretrovirais não indicou proximidade com os resultados de P_{ap} $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ do METO. Tal observação sugere a possível participação de carreadores nos mecanismos de transporte de tais substâncias.

Embora os resultados referentes à 3TC sugiram o envolvimento de transportador de efluxo, não é possível concluir tal interação, uma vez que as células MDCK possuem baixa capacidade preditiva para substância que apresentam mecanismos ativos de permeabilidade. Normalmente, tais células são empregadas em estudos de transporte de fármacos passivamente transportados em etapas iniciais de desenvolvimento farmacêutico por ser de origem biológica e de fácil e rápida execução (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015).

Modelo de perfusão *in situ* versus método *in vitro* em MDCK

Os resultados de permeabilidade nos modelos *in vitro* MDCK e de perfusão *in situ* são complementares. Uma vez que as células MDCK permitem avaliar o transporte passivo de substâncias, é altamente recomendável complementar os resultados em outro modelo, tal como descrito no presente trabalho. Assim, a comparação entre resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais no modelo de perfusão *in situ* indicaram que tais substâncias são prontamente absorvidas a partir do lúmen intestinal para a corrente sanguínea mesentérica nas condições experimentais empregadas.

Os resultados de P_{ap} obtidos por meio do modelo *in vitro* em células MDCK sugerem que os fármacos antirretrovirais apresentam como principal mecanismo de transporte a via transcelular mediada por carreadores, especialmente a estavudina e a lamivudina, uma vez que a análise estatística realizada sobre os resultados de P_{ap} do MDCK indicaram diferenças significativas entre as direções $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$, conforme apresentado na Tabela 2.6 e nas Figura 2.5 e Figura 2.6.

Entretanto, nenhum fármaco antirretroviral apresentou valores de P_{ap} próximos aos valores observados para o METO, tanto no sentido $A \rightarrow B$ quanto no sentido $B \rightarrow A$, o que sugere que os fármacos estudados possam ser substratos de carreadores presentes na membrana biológica e o transporte passivo transcelular não constitui a principal via de transporte das referidas substâncias.

Apesar de ser possível encontrar resultados de permeabilidade intestinal em modelo de perfusão *in situ* na literatura, é de suma relevância destacar que a predição da permeabilidade em seres humanos baseada apenas nos resultados de

permeabilidade efetiva obtidos em ratos pode não refletir o real mecanismo de transporte dos compostos estudados. Em outras palavras, alguns fatores, tais como mecanismos de efluxo e metabolismo, podem não ser evidentes em estudos baseados apenas na quantificação do fármaco presente no lúmen intestinal (CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017).

Por outro lado, estudos de perfusão *in situ* que considerem o aparecimento do fármaco no sangue mesentérico pode, de fato, contribuir para avaliar o transporte de substância do lado apical para o lado basolateral, o que auxilia na avaliação mais precisa da F_a e na compreensão dos valores de biodisponibilidade oral.

Entretanto, uma vez que todos os mecanismos de transporte estão presentes no modelo de perfusão *in situ*, nem sempre resultados elevados de P_{ef} ou de P_{ap} podem indicar que o principal mecanismo de transporte seja a via transcelular passiva. Por outro lado, a realização de estudos complementares de permeabilidade em células MDCK pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de absorção sofridos pelos compostos em estudo, conforme observado nos resultados obtidos pelo presente trabalho.

Assim, os resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos marcadores permitiram concluir que a metodologia experimental empregada foi adequada para a realização dos ensaios de perfusão com os fármacos antirretrovirais do presente estudo, uma vez que ambos apresentaram valores de alta e de baixa permeabilidade estatisticamente significativos.

Os resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais d4T e AZT apresentaram-se próximos dos valores obtidos para o METO. Entretanto o estudo bidirecional em MDCK indicou que a permeabilidade $B \rightarrow A$ da d4T foi significativamente maior que sua permeabilidade $A \rightarrow B$. Isto sugere que esta substância pode ter interações com carreadores que podem explicar sua faixa variável de biodisponibilidade *in vivo*. Já a permeabilidade bidirecional em MDCK da AZT apresentou valores de P_{ap} semelhantes nos dois sentidos (QUEVEDO; BRIÑÓN, 2009; SOARES et al., 2013; ZHU et al., 2002).

Já a 3TC apresentou valores de P_{ef} e P_{ap} em modelo de perfusão *in situ* distante do METO, mas não distante da RNT. A comparação deste comportamento com os resultados de permeabilidade bidirecional em MDCK mostraram, assim

como a d4T, valores estatisticamente diferentes, o que sugere, mais uma vez, a provável interação da 3TC com carreadores de influxo e/ou efluxo.

Estudos descritos na literatura discutem a provável interação da 3TC com carreadores de influxo (OCT, *organic cation transporter*) e de efluxo (P-gp), o que corroborar com os resultados obtidos no presente estudo e com os dados de F_a encontrados em seres humanos (REIS et al., 2013; SABO et al., 2002).

CONCLUSÃO

Os resultados de P_{ef} e P_{ap} dos fármacos antirretrovirais obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* demonstraram que a d4T e a AZT apresentam elevada permeabilidade. Já a 3TC apresentou um valor proporcionalmente menor de P_{ap} em relação ao seu resultado de P_{ef} em comparação com os outros antirretrovirais, o que sugere a interação da 3TC com transportadores de influxo e/ou efluxo.

Já os resultados de permeabilidade bidirecional indicaram que tanto a d4T quanto a 3TC apresentam interações possíveis com transportadores presentes nas monocamadas celulares.

Assim, a comparação dos resultados de permeabilidade obtidos por meio dos modelos *in vitro* MDCK e de perfusão *in situ* indicou que a d4T e a 3TC apresentam interações com carreadores durante os processos de permeação, o que pode estar relacionado com os valores de F_a encontrados na literatura. Já para a AZT, embora existam estudos publicados que discutem a interação deste fármaco com carreadores, tais interações não se apresentam clinicamente significativas, uma vez que a permeabilidade da AZT ocorre prontamente.

Com base no exposto, os fármacos d4T e 3TC apresentam possíveis interações com carreadores de influxo e/ou efluxo, enquanto que a AZT não apresentou tais evidências nos resultados obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* e *in vitro* MDCK.

Deste modo, a investigação dos impactos causados pela interação de carreadores com os fármacos antirretrovirais deve ser realizada com a finalidade de compreender a interferência causada por tais interações na biodisponibilidade oral, uma vez que os fármacos antirretrovirais empregados neste estudo são amplamente utilizados em associação e por períodos prolongados. Estudos complementares que se propõem a elucidar a intensidade de interação entre as referidas substâncias e os carreadores de efluxo podem, a médio e a longo prazo, favorecer a melhoria de formas farmacêuticas para elevar a biodisponibilidade de tais fármacos sem, no entanto, comprometer a segurança na terapia de combate à Aids.

REFERÊNCIAS

AIDSINFO. FDA-Approved HIV Medicines. Disponível em: <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diário Oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

ANVISA/BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN No 10, DE 29 DE SETEMBRO DE 2016. [s.l: s.n.].

AVDEEF, A. **Absorption and Drug Development**: solubility, permeability and charge state. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Interscience, 2003.

AVMA. AVMA Guidelines on Euthanasia American Veterinary Medical. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:AVMA+guidelines+on+euthanasia#0>>.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V.; SINKO, P. J. Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 39, n. 1–3, p. 183–209, 1999.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Evaluation of Permeability and P-glycoprotein Interactions: Industry Outlook. **Biopharmaceutics Applications in Drug Development**, p. 101–138, 2008.

BERGGREN, S. et al. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 553–560, 2004.

BOHETS, H. et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 367–383, 2001.

BOURDET, D. L.; POLLACK, G. M.; THAKKER, D. R. Intestinal absorptive transport of the hydrophilic cation ranitidine: A kinetic modeling approach to elucidate the role of uptake and efflux transporters and paracellular vs. transcellular transport in Caco-2 cells. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1178–1187, 2006.

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

BUCKLEY, S. T. et al. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 235–250, 2012.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, 2015.

CHECA, A. et al. Fast determination of pKa values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. **Analytica Chimica Acta**, v. 554, n. 1–2, p. 177–183, 2005.

CHEN, X. et al. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1511–1520, 2008.

COLLETT, A. et al. Modulation of the permeability of H₂ receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 1, p. 171–178, 1999.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAHAN, A. et al. High-permeability criterion for BCS classification: Segmental/pH dependent permeability considerations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1827–1834, 2010.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DANELIAN, E. et al. SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: Correlation with fraction absorbed in humans. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2083–2086, 2000.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: **Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. [s.l.: s.n.]. p. 182–215.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

ERIKSSON, A. H. et al. The intestinal absorption of a prodrug of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 is mediated by PEPT1: In situ rat intestinal perfusion studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1574–1581, 2010.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1336–1342, 1996.

FAGERHOLM, U.; LENNERNÄS, H. Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 5, p. 247–253, 1995.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 199–219, 1997.

GRIFFIN, B.; O'DRICOLL, C. Models of the Small Intestine. In: Drug Absortions Studies. [s.l: s.n.]. p. 34–65.

HERAI, H. et al. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 88–93, 2007.

INCECAYIR, T.; TSUME, Y.; AMIDON, G. L. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and caco-2 cells: Use as a reference standard for BCS classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 958–966, 2013.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin – Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 28–33, 1999.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1007–1010, 1998.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

KORTEJÄRVI, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ranitidine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 8, p. 1617–1625, 2005.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A.L. Jejunal permeability: A comparison between the ussing chamber technique and the Single-Pass perfusion in humans. **Pharmaceutical Research**, 1997.

LI, M. et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 37–45, 2011.

LOPES, M. A. et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1139–1151, 2014.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MASAOKA, Y. et al. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 240–250, 2006.

MOLS, R. et al. Intestinal perfusion with mesenteric blood sampling in wild-type and knockout mice: Evaluation of a novel tool in biopharmaceutical drug profiling. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 6, p. 1334–1337, 2009.

NEWBY, D.; FREITAS, A. A.; GHAFOURIAN, T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 751–765, 2015.

PRETORIUS, E.; BOUIC, P. J. D. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 270–275, 2009.

QUEVEDO, M. A.; BRIÑÓN, M. C. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. **Antiviral Research**, v. 83, n. 2, p. 103–111, 2009.

RATHORE, R. et al. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 374–380, 2008.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SABO, J. P. et al. Pharmacokinetics of nevirapine and lamivudine in patients with HIV-1 infection. **AAPS PharmSci**, v. 2, n. 1, 2002.

SALPHATI, L. et al. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 7, p. 1007–1013, 2001.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SICCARDI, D. et al. Stereoselective and concentration-dependent polarized epithelial permeability of a series of phosphoramidate triester prodrugs of d4T: an in vitro study in Caco-2 and Madin-Darby canine kidney cell monolayers. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 3, p. 1112–1119, 2003.

SILVA, A. L. L. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Stavudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, n.1, 2012.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

STAPPAERTS, J. et al. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: Challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 665–681, 2015.

STRAUCH, S. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Lamivudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011.

SUGANO, K. et al. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 181–188, 2001a.

SUGANO, K. et al. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. **Journal of Biomolecular screening: Tthe Official Journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 6, n. 3, p. 189–196, 2001b.

SUTTON, S. C.; RINALDI, M. T.; VUKOVINSKY, K. E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and ¹⁴C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 3, p. E25, 2001.

SVENSSON, U. S. H. et al. High in situ rat intestinal permeability of artemisinin unaffected by multiple dosing and with no evidence of P-glycoprotein involvement. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 2, p. 227–232, 1999.

SY, S. K. B. et al. Effect of reducing the paediatric stavudine dose by half: A physiologically-based pharmacokinetic model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 413–419, 2015.

TAKAMATSU, N. et al. Human jejunal permeability of two polar drugs: Cimetidine and ranitidine. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 742–744, 2001.

THOMSON, A. B. R. et al. Intestinal uptake of fatty acids and cholesterol in four animals species and man: Role of unstirred water layer and bile salt micelle. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, v. 75, n. 2, p. 221–232, 1983.

TRAPANI, G. et al. Frog intestinal Sac: A new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 12, p. 2909–2919, 2004.

TUKKER, J. J. In vitro methods for the assessment of permeability. In: DRESSMAN, J. B.; LENNERNÄS, H. (Eds.). **Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment**. New york: Marcel Dekker, inc, 2000. p. 51–72.

UCHIDA, M. et al. A modified fast (4 days) 96-well plate Caco-2 permeability assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 59, n. 1, p. 39–43, 2009.

VOLPE, D. A. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: **Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. N: Springer, 2008. v. VIIp. 665–680.

WACLAWSKI, A. P.; SINKO, P. J. Oral absorption of anti-acquired immune deficiency syndrome nucleoside analogues. 2. Carrier-mediated intestinal transport of stavudine in rat and rabbit preparations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 478–485, 1996.

WATANABE, E.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal

permeability assessed by an in vitro chamber method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 659–665, 2004.

YU, H.; SINKO, P. J. Influence of the microporous substratum and hydrodynamics on resistances to drug transport in cell culture systems: Calculation of intrinsic transport parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 12, p. 1448–1457, 1997.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 624–630, 2005.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion to rat. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 368–379, 2007.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 102–106, 2009.

ZHU, C. et al. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 399–407, 2002.

**CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE EFLUXO
DOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DOS
MODELOS DE PERFUSÃO *IN SITU* E *IN VITRO* EM MDCK-
MDR1**

RESUMO

Fármacos oralmente administrados necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade em seus sítios de absorção para que uma boa biodisponibilidade oral ocorra. Esta, por sua vez, pode ser influenciada por diferentes fatores, os quais podem estar relacionados aos mecanismos de transporte que ocorrem na parede do trato gastrointestinal (TGI). O transporte de efluxo, causado principalmente pela ação da glicoproteína-P (P-gp), é capaz de interferir na biodisponibilidade de fármacos substratos. A avaliação da influência da P-gp é de suma importância no desenvolvimento e na caracterização de fármacos, pois a biodisponibilidade incompleta observada para algumas substâncias pode estar relacionada à atuação deste carreador. Alguns estudos de efluxo realizados por meio de diferentes métodos podem ser encontrados na literatura. O modelo de perfusão *in situ* tem sido amplamente utilizado em estudos de permeabilidade de fármacos para prever sua absorção em seres humanos. Entretanto, experimentos que visam avaliar a influência da P-gp sobre os processos absorptivos são mais raros neste modelo. Por outro lado, estudos de efluxo em monocamadas de células MDCK-MDR1 têm sido frequentemente reportados na literatura para diferentes classes de fármacos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do mecanismo de efluxo causado pela P-gp sobre a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico e do modelo *in vitro* com o emprego de células MDCK-MDR1. Para os estudos de perfusão *in situ*, ratos machos da linhagem Wistar foram submetidos à anestesia e o jejuno foi canulado para permitir a introdução da solução contendo cada fármaco solubilizado. A veia mesentérica foi também canulada para permitir a coleta de amostras de sangue em intervalos de tempo predeterminados. Em seguida, os experimentos foram conduzidos na presença e na ausência de inibidor de P-gp verapamil (VRP). Já em MDCK-MDR1, os ensaios foram realizados bidirecionalmente, ou seja, no sentido apical-basolateral (A→B) e basolateral-apical (B→A), com a finalidade de determinar a interação entre o fármaco e o carreador na presença e na ausência de inibidor de P-gp GG918. Os resultados de permeabilidade em modelo de perfusão *in situ* indicaram que os três fármacos antirretrovirais interagem de alguma maneira com a P-gp, embora a d4T não tenha apresentado aumento significativo. A comparação entre os resultados obtidos indicou um aumento mínimo de 20% nos valores de permeabilidade da 3TC e da AZT quando o verapamil foi empregado. Comportamento semelhante foi observado para os resultados de permeabilidade obtidos por meio dos ensaios em MDCK-MDR1. Neste caso, os valores da razão B→A/A→B para cada fármaco foram: 1,6 para a d4T, 2,0 para a 3TC e 2,6 para a AZT. Com base nos valores obtidos, a 3TC e a AZT apresentaram interações significativas com a P-gp, o que sugere que tais fármacos são substratos desta glicoproteína. Por outro lado, a elevada fração absorvida (F_a) da AZT (98%) sugere que a interação entre este fármaco e a P-gp é clinicamente insignificante e outros fatores estão provavelmente associados à sua moderada biodisponibilidade (66%). Logo, a concordância entre os resultados obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* e do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 demonstrou que ambos são complementares e adequados para avaliar o mecanismo de efluxo de fármacos potencialmente substratos da P-gp. No entanto, o emprego isolado de cada modelo não é recomendado, uma vez que o intestino apresenta diferentes carreadores enquanto que as células MDCK-MDR1 podem avaliar a interação fármaco-P-gp devido à superexpressão deste carreador.

Palavras-chave: antirretrovirais; efluxo; MDCK-MDR1; perfusão *in situ*; permeabilidade; P-gp.

INTRODUÇÃO

A administração oral de medicamentos constitui a principal via pela qual um fármaco é colocado em contato com o organismo, sendo a forma farmacêutica sólida a forma de dosagem mais comum e conveniente para este fim. Quando ingerida, a forma farmacêutica necessita desintegrar-se e solubilizar-se adequadamente nos líquidos presentes ao longo do trato gastrointestinal (TGI). Uma vez solubilizado, o fármaco precisa ainda ser capaz de atravessar a parede do TGI a fim de alcançar a corrente sanguínea para que sua absorção ocorra. Deste modo, as características de solubilidade e de permeabilidade constituem importantes etapas, embora não sejam determinantes, para que ocorra uma boa biodisponibilidade oral (AMIDON et al., 1995; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2016).

Com base na solubilidade e na permeabilidade, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que classifica os fármacos em quatro classes distintas: I (alta solubilidade e alta permeabilidade); II (baixa solubilidade e alta permeabilidade); III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Embora o SCB permita a classificação de substâncias em relação às suas características de permeabilidade, os mecanismos de transporte que ocorre nos processos de absorção oral não são considerados neste sistema. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto com base nas características de solubilidade e de metabolismo dos fármacos. Além disso, o SCBDF tem apresentado um importante papel em relação ao envolvimento de carreadores no transporte de substâncias, de acordo com as quatro classes biofarmacêuticas: I (alta solubilidade e metabolismo extenso, efeito mínimo de transportadores de influxo e efluxo); II (baixa solubilidade e metabolismo extenso, pode sofrer efeitos de efluxo); III (alta solubilidade e baixo metabolismo, poderá haver efeitos de influxo e/ou efluxo) e IV (baixa solubilidade e baixo metabolismo, efeito significativo de transportadores de influxo e efluxo). Este sistema considera os efeitos de transportadores em diferentes regiões do organismo, inclusive no TGI (BENET, 2013; LARREGIEU; BENET, 2014; WU; BENET, 2005).

No TGI, grande parte dos processos absorptivos ocorrem nas porções proximais do intestino delgado, especialmente no duodeno e na região proximal do

jejuno. Mais especificamente, as células absorptivas denominadas enterócitos são dispostas ao longo do TGI e são especializadas na absorção de nutrientes e outras substâncias, inclusive fármacos. A Figura 3.1 apresenta esquematicamente a monocamada de enterócitos, suas principais estruturas e as vias de transporte mais relevantes em relação à absorção de fármacos (AMIDON et al., 1995; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008; DEZANI et al., 2017).

Figura 3.1: Representação esquemática da monocamada de enterócitos mostrando os lados apical e basolateral, as junções intercelulares, microvilosidades e as principais vias envolvidas nos mecanismos de transporte de fármacos: (A) transporte passivo paracelular; (B) transporte passivo transcelular; (C) transporte ativo mediado por carreador de efluxo; (D) transporte ativo mediado por carreador de influxo e (E) endocitose (Adaptado de Dezani et al., 2017 - *ahead of print*).

Dentre os mecanismos de transporte conhecidos, é importante destacar a ação dos carreadores de efluxo, os quais podem interferir de maneira significativa nos processos de absorção e causar grandes impactos na biodisponibilidade de fármacos oralmente administrados, caso estes sejam substratos. O principal tipo de carreador de efluxo corresponde à glicoproteína-P (P-gp), sendo esta alvo de estudos recentes

reportados na literatura para avaliar o impacto da sua ação sobre os processos absorptivos de fármacos (ANTUNES et al., 2013; JUNIOR et al., 2015).

Diferentes modelos destinados à avaliação da permeabilidade de fármacos têm sido também empregados nos estudos de transporte de efluxo. Entretanto, é importante destacar que cada modelo apresenta vantagens e limitações em relação aos experimentos realizados. Culturas celulares podem ser facilmente empregadas para esta finalidade, porém nem todas as linhagens podem auxiliar na identificação de um potencial substrato da P-gp, uma vez que a expressão de carreadores é variável, diversificada e dependente de diferentes fatores como tipo e idade celular, por exemplo (ESTUDANTE et al., 2013b; JUNIOR et al., 2015).

Dentre as linhagens celulares, a MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) transfectada com o gene MDR1 (*multi-drug resistance*) é muito utilizada para estudos de transporte de efluxo por permitir a superexpressão da P-gp na porção apical da monocamada celular formada, o que permite uma avaliação mais precisa da interação entre o fármaco avaliado e o carreador de efluxo. A realização de experimentos na ausência e na presença de inibidores específicos da P-gp auxilia na identificação de compostos substratos desta glicoproteína. Entretanto, o uso isolado deste modelo não permite concluir sobre as características de permeabilidade dos fármacos avaliados (ESTUDANTE et al., 2013b).

Desta forma, estudos realizados em modelo que se assemelha às condições *in vivo* podem complementar o desenho experimental empregado para a avaliação do transporte de efluxo de substâncias. O modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico permite avaliar o impacto da interação fármaco-carreador de efluxo em condições próximas às que ocorrem *in vivo* por meio de ensaios realizados na presença e na ausência de inibidores de P-gp.

É importante destacar que a coleta de amostras de sangue durante os ensaios de perfusão *in situ* permite verificar a presença do fármaco no sangue mesentérico em intervalos regulares de tempo. Desta forma, a avaliação da permeabilidade de substâncias é mais precisa, uma vez que os mecanismos de transporte podem não ser esclarecidos quando somente o perfusato é analisado (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017; JUNIOR et al., 2015).

A avaliação do transporte de efluxo por meio de dois modelos (MDCK-MDR1 e perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico) permite prever os mecanismos envolvidos na absorção *in vivo* de fármacos que apresentam biodisponibilidade

variável, tal como observado para os fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT). Conforme numerosos relatos na literatura, o emprego de segmentos intestinais provenientes de ratos apresenta elevada correlação com os dados obtidos em seres humanos (AMIDON; SINKO; FLEISHER, 1988; DEZANI et al., 2017; FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; SALPHATI et al., 2001).

Embora as células MDCK-MDR1 permitam estudar com maior clareza a interação fármaco-P-gp, é praticamente impossível concluir a respeito do impacto clínico com base somente nos resultados obtidos neste modelo *in vitro*. Assim, a associação entre os experimentos em MDCK-MDR1 e o modelo de perfusão *in situ* permitirá obter conclusões mais significativas em relação aos mecanismos de transporte, uma vez que os segmentos intestinais utilizados expressam os carreadores de maneira biorrelevante (DEZANI et al., 2017; ESTUDANTE et al., 2013a; JUNIOR et al., 2015).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do mecanismo de efluxo sobre a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico e do modelo *in vitro* MDCK-MDR1. Uma vez que tais substâncias apresentam biodisponibilidade variável, é de suma importância analisar se o transporte de efluxo está envolvido na biodisponibilidade incompleta destes fármacos. Tais dados não são descritos na literatura e necessitam de uma investigação mais aprofundada, uma vez que estes compostos são amplamente utilizados na farmacoterapia contra a Aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) em pacientes com diferentes faixas etárias e estados patológicos. Além disso, os três antirretrovirais são amplamente utilizados em associação e de maneira crônica, o que não exclui a possibilidade de utilização de outros medicamentos por parte dos pacientes.

Assim, a avaliação do mecanismo de efluxo não permite apenas investigar o impacto deste transporte sobre a permeabilidade de fármacos, mas também auxiliar no aprimoramento das etapas de desenvolvimento farmacêutico de novas formulações e/ou compostos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foram gentilmente doados pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, SP, Brasil). As substâncias utilizadas como marcadores de alta e de baixa permeabilidade metoprolol (METO) e ranitidina (RNT), respectivamente, foram doadas pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, SP, Brasil).

A linhagem de células MDCK-MDR1 foi fornecida pelo Dr. Ira Paston do Instituto Nacional do Câncer pertencente ao Centro Nacional da Saúde (NCI/NIH, EUA). Solução tampão de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM-H21*) com 1% de solução penicilina-estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SBF) foram adquiridas da Unidade de Cultura Celular da Universidade da Califórnia San Francisco (UCC/UCSF, San Francisco, CA, EUA). Solução tampão balanceada de Hanks (*Hank's Balanced Salt Solution, HBSS*) isento de íons cálcio e magnésio, solução tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico) 1M e solução de tripsina (0,25%) também foram obtidos da UCC/UCSF. Solução de colchicina (40 nM) foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Frascos para cultivo celular de 75 cm³ de área (frascos T-75) e suportes com filtro permeável (*inserts*) foram obtidos da *BD Falcon* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As placas com seis poços utilizadas para o cultivo das monocamadas e para os experimentos foram obtidos da *Corning Incorporated* (Corning, NY, EUA). As substâncias GG918 (elacridar), verapamil (VRP) e DMSO (dimetilsufóxido) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Solução tampão fosfato salino (PBS) isento de íons cálcio e magnésio foi obtida da UCC/UCSF.

Avaliação do transporte de efluxo em modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

Os procedimentos realizados em animais foram avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) e o presente trabalho obteve resposta favorável para a realização dos experimentos sob o número de protocolo CEUA/FCF/404.

Sangue proveniente de ratos doadores foi empregado para reposição do volume de sangue coletado dos ratos submetidos aos experimentos de perfusão *in situ*. Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) foram anestesiados seguindo os mesmos protocolos de jejum e anestesia empregados nos animais submetidos aos estudos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

O sangue de ratos doadores foi coletado sob condições assépticas por punção intracardíaca com seringa contendo anticoagulante CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose e adenina).

Preparo da solução de perfusão

A solução de perfusão empregada nos ensaios de perfusão *in situ* foi preparada com a seguinte composição: NaCl 48 mM, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 28 mM, NaH₂PO₄ 43 mM, manitol 35 mM, PEG 4000 1g/L e D-glicose anidra 10 mM (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007). Todos os componentes foram totalmente solubilizados em água ultrapurificada (Milli-Q) e o pH foi ajustado para 6,5 com soluções de HCl ou KOH (DEZANI et al., 2016; ERIKSSON et al., 2010; RATHORE et al., 2008). Em seguida, a preparação foi submetida a banho de ultrassom por 30 minutos.

À solução de perfusão foi acrescentado o fármaco ou o marcador de maneira individualizada, com base na maior dose prescrita para seu respectivo produto comercial de acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*). Assim, a concentração de cada substância foi determinada pela divisão da maior dose pelo volume de 250 mL, o qual foi considerado a fim de obter a maior concentração possível do fármaco no lúmen intestinal (CDER/FDA, 2000, 2015a; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013). Desta forma, a maior dose prescrita e as concentrações preparadas foram: 40 mg e 0,16 mg/mL para a d4T; 300 mg e 1,20 mg/mL para a 3TC, AZT e RNT e de 100 mg e 0,40 mg/mL para METO (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016).

Para os estudos de transporte, o VRP foi utilizado como inibidor de P-gp na concentração de 200 µM e foi adicionado à solução de perfusão contendo o fármaco ou o marcador previamente solubilizado (MUDRA; BORCHARDT, 2010).

Ensaio de perfusão *in situ*

Os experimentos de perfusão *in situ* empregados para avaliar a influência do transporte de efluxo na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais foi realizada em duas etapas: na ausência e na presença do inibidor de P-gp (VRP).

Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com faixa de peso 250-300g foram empregados nos estudos de transporte de efluxo. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo.

Os ratos foram submetidos a um período de jejum de 12 horas com acesso livre à água. Em seguida, foi realizada anestesia com injeção intramuscular de cetamina-xilazina nas concentrações de 0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente. A necessidade de manutenção anestésica durante a execução dos experimentos foi atendida com $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ da dose inicial (DEZANI et al., 2016, 2017; LI et al., 2011).

Após a indução anestésica, os animais foram acomodados sobre superfície aquecida a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ para melhor conforto e controle da anestesia (DEZANI et al., 2016, 2017).

Em seguida, uma abertura na cavidade abdominal foi realizada para permitir o acesso ao segmento intestinal de interesse. Cerca de 10 cm do jejuno foi isolado e uma cânula plástica foi cuidadosamente inserida na porção proximal, o que permitiu a entrada da solução de perfusão no interior do segmento intestinal. Outra cânula foi inserida na porção distal para permitir a coleta das amostras de perfusato em intervalos predeterminados durante os experimentos. A cavidade abdominal exposta foi mantida úmida e aquecida com solução fisiológica a 37°C durante todo o período dos ensaios (BERGGREN et al., 2004; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; KIM et al., 2006).

Uma vez que os experimentos de perfusão *in situ* previam a coleta de sangue mesentérico em intervalos regulares, uma cânula previamente heparinizada foi inserida cuidadosamente na veia mesentérica. Em seguida, a veia jugular foi também canulada e utilizada como via de acesso para a reposição do volume de sangue no animal submetido ao estudo de perfusão *in situ* (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

As soluções de perfusão foram mantidas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante todo o período experimental e o volume de entrada foi controlado por meio do uso de uma bomba peristáltica com o objetivo de uniformizar o fluxo.

Primeiramente, a solução de perfusão isenta de fármaco foi perfundida por um período aproximado de 30 minutos a um fluxo de 0,5 mL/min com a finalidade de remover o conteúdo luminal do segmento intestinal selecionado para o estudo (DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013).

Em seguida, a solução de perfusão contendo o fármaco ou o marcador solubilizado foi perfundida a um fluxo de 0,2 mL/min. Os primeiros 60 minutos de perfusão corresponderam ao período para que o fármaco ou o marcador entrassem em equilíbrio com a parede intestinal submetida ao estudo (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

Após atingir o estado de equilíbrio, os experimentos foram iniciados com a adição do fármaco ou do marcador no lúmen intestinal. As amostras de perfusato foram coletadas em intervalos regulares de tempo (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos) em microtubos, os quais foram pesados antes e depois das coletas para permitir o cálculo da taxa de fluxo de água (TFA). As amostras foram congeladas a -20°C para posterior análise por método cromatográfico (DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

Em relação às amostras de sangue, estas foram coletadas aos 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da veia mesentérica. A reposição do volume sanguíneo coletado foi feita através do acesso na veia jugular.

As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a 3500 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos e o plasma foi separado e congelado a -20°C até a realização das análises por método cromatográfico.

Após a coleta de todas as amostras, foi realizado o aprofundamento da anestesia nos animais para possibilitar a eutanásia com a administração de solução saturada de KCl por via intracardíaca (AVMA, 2007; DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; LI et al., 2011; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Em seguida, cada segmento de jejuno empregado nos estudos de perfusão *in situ* foi removido para permitir a realização das medições de comprimento (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; REIS et al., 2013).

Os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados com as soluções de perfusão contendo o fármaco ou o marcador e o inibidor de P-gp VRP.

Cálculos relacionados aos ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

A permeabilidade efetiva (P_{ef}) foi calculada a partir da Equação 3.1 (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; ERIKSSON et al., 2010; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; REIS et al., 2013):

$$P_{ef} = - \frac{Q_{entrada}}{A} \times \ln \left(\frac{C_{saída, corrigida}}{C_{entrada}} \right)$$

Equação 3.1

onde: P_{ef} é a permeabilidade efetiva do fármaco ou do marcador; $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada da solução de perfusão; A é a área intestinal ($2\pi RL$) disponível para a absorção, considerando o comprimento (l) e o raio do intestino (R); $C_{saída, corrigida}$ corresponde à concentração corrigida do fármaco ou marcador na saída do segmento intestinal e $C_{entrada}$ é a concentração do fármaco ou marcador na entrada do intestino.

A partir dos resultados de P_{ef} obtidos em ratos, a fração da dose oral absorvida (F_a) em seres humanos foi calculada a partir da Equação 3.2 sugerida por Sugano e colaboradores (2001) (DEZANI et al., 2016, 2017; ESCRIBANO et al., 2012; JUNIOR et al., 2015; SUGANO et al., 2001b).

$$F_a = 1 - \exp \left(-38450 \times P_{ef, ratos} \right)$$

Equação 3.2

onde: $P_{ef, ratos}$ é a permeabilidade efetiva obtida a partir dos ensaios com ratos empregando o modelo de perfusão *in situ*.

Para realizar a correção da TFA sobre a concentração da substância no perfusato, foi utilizado o método gravimétrico (DEZANI et al., 2016; SUTTON;

RINALDI; VUKOVINSKY, 2001). A TFA foi calculada de acordo com a Equação 3.3 apresentada abaixo:

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{saída}}{Q_{entrada}} \right) \right] \frac{Q_{entrada}}{l}$$

Equação 3.3

onde: $Q_{entrada}$ corresponde ao fluxo de entrada da solução de perfusão no interior do segmento intestinal; $Q_{saída}$ é o fluxo de saída da solução de perfusão em um intervalo de tempo predefinido e l é o comprimento do segmento intestinal selecionado para o estudo.

Para as amostras de sangue coletadas a partir da veia mesentérica, foram calculados os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap}) de acordo com a Equação 3.4:

$$P_{ap} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_{doador}}$$

Equação 3.4

onde: Q corresponde à quantidade acumulada do fármaco que aparece no sangue mesentérico em função do tempo t sob a condição de equilíbrio; A é a área de superfície intestinal disponível para a absorção e C_{doador} é a concentração do fármaco ou marcador na solução de perfusão.

Avaliação do transporte de efluxo em modelo *in vitro* MDCK-MDR1

Os experimentos em modelo *in vitro* MDCK-MDR1 foram realizados em conjunto com a equipe do Professor Leslie Z. Benet da Universidade da Califórnia San Francisco.

Preparo das culturas celulares MDCK-MDR1

A solução DMEM-H21 suplementada com SBF, estreptomicina, penicilina e colchicina foi empregada como meio de cultivo no preparo e na manutenção das culturas celulares. Este meio foi adicionado em frasco T-75 contendo a suspensão de células MDCK-MDR1. O sistema foi acondicionado em incubadora de CO₂ ajustada em 37±1°C com 5% de CO₂ e atmosfera úmida em 95% (DE SOUZA et al., 2009). A troca do meio de cultivo foi realizada periodicamente (24-48 horas) até atingir a confluência celular adequada para a próxima troca de frasco ou para a preparação das placas a serem empregadas nos experimentos de transporte.

Após atingir a confluência de 85-95% de crescimento celular na área do frasco T-75, foi realizado o preparo da próxima passagem para novo frasco T-75. Solução de tripsina (0,25%) foi adicionada ao frasco para deslocar as células da parede do recipiente e permitir a formação da suspensão celular, a qual foi distribuída nas placas destinadas ao crescimento das monocamadas celulares a serem empregadas nos estudos de transporte.

Para o preparo das placas de cultivo de 6 poços, foi considerada a faixa de passagem 4-10. Após a obtenção da suspensão celular, esta foi transferida a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ células/suporte com filtro permeável. Cada suporte, por sua vez, foi inserido nas placas de cultivo previamente preenchidas com o meio DMEM-H21 descrito anteriormente. Em seguida, os suportes com filtro permeável foram preenchidos com o meio de cultivo, permitindo o contato das células com o meio em ambos os lados (apical e basolateral). Uma vez preparadas, as placas de cultivo foram incubadas nas mesmas condições que os frascos T-75. A troca do meio de cultivo foi realizada a cada 24-48 horas com a finalidade de manter as células viáveis em função do fornecimento dos nutrientes contidos no meio.

Verificação da viabilidade celular

A integridade e a viabilidade das monocamadas celulares MDCK-MDR1 foram avaliadas por meio da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) por meio do uso do voltímetro Millicell®-ERS (Millipore, MA, EUA).

A faixa de valores de TEER adotada foi de 1500 a 2000 Ω cm². As monocamadas que estiveram fora desta faixa foram desconsideradas para a realização dos experimentos de transporte (SOLDNER et al., 2000).

De maneira complementar, os marcadores de permeabilidade METO e RNT foram empregados para avaliar a viabilidade das células MDCK-MDR1.

Estudo bidirecional de transporte em MDCK-MDR1

O estudo bidirecional de transporte em MDCK-MDR1 dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foram realizados com tamanho amostral de 3 (n=3) considerando duas condições: na ausência e na presença de inibidor de P-gp (GG918). Assim, para cada fármaco, duas placas foram empregadas nos estudos de transporte. A primeira placa foi destinada aos experimentos sem inibidor de P-gp enquanto que a segunda placa foi utilizada nos experimentos com o inibidor. Para cada placa, três poços foram destinados aos estudos na direção A→B (apical-basolateral) e três poços aos estudos na direção B→A (basolateral-apical).

Após o período de incubação e a obtenção da confluência adequada de crescimento das monocamadas celulares (85-95%), procedeu-se os experimentos de transporte de efluxo. As placas foram removidas da incubadora e o meio de cultivo foi substituído pela solução empregada como meio nos estudos em MDCK-MDR1 com o objetivo de promover a lavagem das células. Tal solução consistiu de mistura de HBSS com 25 mM de HEPES e 1% SBF (pH 7,4 a 37±1°C). Esta preparação foi fracionada em quatro porções, as quais foram distribuídas da seguinte maneira: HBSS branco (sem fármaco) adicionado no lado receptor das placas (estudo sem inibidor), HBSS com o fármaco adicionado no lado doador das placas (estudo sem inibidor), HBSS branco com GG918 (sem fármaco) adicionado no lado receptor das placas (estudo com inibidor), HBSS com o fármaco e com GG918 (estudo com inibidor) adicionado no lado doador das placas.

Durante o período de lavagem das células, novas placas de seis poços foram peraparadas para os estudos de transporte de acordo com o desenho experimental. Após a lavagem, o conteúdo foi completamente removido dos poços e os suportes permeáveis foram transferidos para as novas placas previamente preenchidas com as respectivas soluções HBSS.

Os ensaios de transporte foram iniciados a partir do momento do contato das monocamadas celulares com as soluções HBSS contendo os fármacos a 15 μM (na presença ou ausência do inibidor de P-gp GG918 a 0,5 μM). Em seguida, cada suporte com filtro permeável foi preenchido com a solução HBSS correspondente e as placas foram levadas imediatamente à incubadora com agitação oscilante ajustada em $37\pm 1^\circ\text{C}$. As amostras foram coletadas (200 μL) a partir dos compartimentos receptores de cada poço em intervalos regulares de tempo em 30, 60 e 90 minutos com reposição de meio HBSS isento de fármaco a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

Após a coleta de todas as amostras, as monocamadas celulares foram imediatamente lavadas com solução fria de PBS a 4°C e expostas à temperatura ambiente até secagem completa. Posteriormente, as monocamadas foram removidas de seus suportes e colocadas em recipientes de vidro individuais contendo 1 mL de solução de acetonitrila:água (75:25% v/v) para extrair a quantidade de fármaco presente nas células MDCK-MDR1. Os recipientes foram levados em banho ultrassônico por 15 minutos e o conteúdo obtido foi separado em microtubos, os quais foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram congeladas a -20°C até a quantificação dos fármacos por método de espectrometria de massas.

Cálculos relacionados aos ensaios *in vitro* MDCK-MDR1

Para os estudos em MDCK-MDR1, o cálculo da permeabilidade aparente (P_{ap} em cm/s) foi realizado por meio da Equação 3.5:

$$P_{ap} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

Equação 3.5

onde: $\Delta Q/\Delta t$ é o fluxo em $\mu\text{mol}/\text{min}$ ou a quantidade de fármaco permeado através do segmento intestinal no tempo t ; A é a área de exposição da monocamada celular de MDCK-MDR1 (4,2 cm^2 para MDCK-MDR1) e C_0 corresponde à concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com a monocamada celular MDCK-MDR1 (compartimento doador)(DEZANI et al., 2013; SHAH, 1993; TRAPANI et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliação do transporte de efluxo em modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

Durante a execução dos experimentos de perfusão *in situ*, é comum a ocorrência de absorção e secreção de água no lúmen intestinal, o que pode levar à concentração ou a diluição da substância avaliada. A correção da TFA permitiu avaliar a movimentação de água ao longo do segmento intestinal submetido ao estudo e possibilitou corrigir a concentração do fármaco ou do marcador no interior do lúmen intestinal, a fim de obter resultados de permeabilidade mais precisos e exatos.

Para a correção da TFA, o método gravimétrico foi empregado e os resultados para cada composto nos experimentos realizados na ausência e na presença de inibidor de P-gp são mostrados na Tabela 3.1 (DEZANI et al., 2016, 2017; LUO et al., 2013; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Tabela 3.1: Resultados referentes à TFA ($\mu\text{L}/\text{h}/\text{cm}$) obtidos para cada fármaco ou marcador empregados nos estudos de transporte de efluxo por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência (-) e na presença (+) de VRP (n=6).

Rato	RNT		METO		d4T		3TC		AZT	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
1	2,00	5,26	0,00	2,00	-0,99	2,11	-2,11	-1,11	0,00	2,86
2	-1,00	1,05	1,00	0,87	0,00	1,82	-0,83	1,67	-1,05	1,67
3	-3,00	0,00	2,35	3,33	1,82	2,22	-0,95	1,11	-1,90	1,11
4	4,00	0,91	3,00	1,82	0,95	1,00	0,00	0,91	-1,65	0,91
5	1,00	0,00	1,05	5,00	0,83	2,35	2,94	3,53	0,00	3,53
6	-1,00	-0,95	2,00	1,90	0,00	0,95	0,00	0,00	-1,05	0,00

Conforme apresentado na Tabela 3.1, os valores de TFA obtidos mostraram a ocorrência de absorção e de secreção de água no lúmen intestinal durante os experimentos. Desta forma, os valores negativos indicam que houve secreção de

água para o lúmen intestinal e, portanto, diluição do fármaco ou marcador no perfusato. De maneira oposta, valores positivos indicaram a absorção de água a partir do lúmen intestinal, ocasionando a concentração do fármaco ou do marcador no perfusato (DEZANI et al., 2016, 2017; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Os valores de TFA são normalmente variáveis em razão da dinâmica de transferência de água ao longo do TGI e variam de acordo com alguns fatores, tais como: tipo de composto estudado, conteúdo luminal, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão. Na literatura, a faixa de valores de TFA para ensaios de perfusão *in situ* em jejuno tem sido descrita como sendo entre -318,40 e 90,0 $\mu\text{L/h/cm}$ (DEZANI et al., 2017; ZAKERI-MILANI et al., 2007).

A grande vantagem associada ao uso do método gravimétrico nos estudos de perfusão *in situ* deve-se à não coperfusão de uma substância não absorvível, a qual poderia causar interferências nos estudos de permeabilidade de fármacos (DEZANI et al., 2016, 2017; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos marcadores METO e RNT

Anteriormente à execução dos experimentos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico dos fármacos antirretrovirais, foram realizados ensaios prévios com marcadores de alta e de baixa permeabilidade METO e RNT no intuito de verificar a integridade e a viabilidade do segmento intestinal selecionado para o estudo. A Tabela 3.2 apresenta os resultados de P_{ef} , de P_{ap} e da F_a dos marcadores na ausência e na presença de inibidor de P-gp VRP, enquanto a Figura 3.2 demonstra graficamente os valores de permeabilidade.

Tabela 3.2: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos marcadores (METO e RNT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de transporte por meio do modelo de perfusão *in situ* na ausência (-) e na presença (+) de VRP. Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).

	(-)		(+))		(-)		(+))	
Fármaco	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$F_a \text{ (%) predita}$	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$F_a \text{ (%) predita}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$
METO	5,63±0,47	88	5,49±0,44	88	0,55±0,049	0,60±0,055		
RNT	1,94±0,17	53	2,74±0,30	65	0,17±0,020	0,25±0,036		

Figura 3.2: Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT na ausência e na presença de VRP obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado (n=6).

* quando $p < 0,05$ em relação ao metoprolol e metoprolol + verapamil

** quando $p < 0,05$ em relação à ranitidina

Conforme apresentado na Tabela 3.2 e na Figura 3.2, o METO apresentou os maiores valores de permeabilidade em comparação com a RNT em ambas as condições estudadas (ausência e presença de VRP). Tal observação corrobora com o tipo de mecanismo de transporte desse marcador: transporte passivo transcelular. Além disso, tanto os resultados de P_{ef} quanto os de P_{ap} estão de acordo com a elevada fração absorvida (F_a) reportada na literatura para seres

humanos (95%) (DEZANI et al., 2016, 2017; IRVINE et al., 1999; MOLS et al., 2009; ZHU et al., 2002).

Os valores de F_a preditos para seres humanos foram calculados a partir da Equação 3.2 e nenhuma alteração foi constatada quando o VRP foi empregado como inibidor de P-gp (F_a predita = 88%), conforme apresentado na Tabela 3.2.

Os elevados valores de permeabilidade do METO foram esperados, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Esta observação confirma os dados obtidos por Mols e colaboradores, onde a permeabilidade deste marcador não foi afetada pela presença do VRP em camundongos submetidos a ensaios de perfusão intestinal (MOLS et al., 2009). Em outro estudo descrito por Dahan e Amidon (2009), o transporte do METO em ensaios de perfusão *in situ* também não foi influenciado pela presença do VRP (DAHAN; AMIDON, 2009a).

Em relação aos resultados referentes à RNT, foi possível observar que houve diferença estatística entre os valores de permeabilidade obtidos para os ensaios de perfusão realizados na ausência e na presença de VRP, ou seja, o resultado da RNT foi significativamente menor que o resultado da RNT com verapamil (Figura 3.2).

Consequentemente, os valores preditos de F_a foram maiores em 12% em função do aumento da P_{ef} quando o inibidor de P-gp foi empregado, o que evidencia a interação da RNT com este carreador de efluxo (Tabela 3.2). Assim, a avaliação deste parâmetro indica a significância do efeito da P-gp sobre a permeabilidade do marcador avaliado.

A RNT apresenta como principal rota de transporte a via passiva paracelular. Estudos descritos na literatura apontam que esta substância apresenta interação significativa com o carreador de efluxo P-gp, o que confirma os resultados encontrados no presente trabalho. Além disso, tais dados estão de acordo com a baixa F_a reportada na literatura em seres humanos (em torno de 50%), o que evidencia também seu mecanismo de transporte limitado (COLLETT et al., 1999; IRVINE et al., 1999; KORTEJÄRVI et al., 2005; LEE et al., 2002; SUGANO et al., 2001b). A via passiva paracelular representa cerca de 0,01 a 0,1% da capacidade absorptiva do intestino delgado (ANTUNES et al., 2013; KORTEJÄRVI et al., 2005; LOPES et al., 2014). Assim, os valores de permeabilidade da RNT na ausência e na presença de VRP apresentaram diferenças estatísticas significativas, reforçando

que este marcador é considerado um substrato desta glicoproteína (KIM et al., 2006; KORTEJÄRVI et al., 2005).

Em estudo conduzido por Bourdet, Pollack e Thakker (2006), o transporte da RNT foi estudado com a finalidade de esclarecer o mecanismo envolvido na absorção desta substância. Assim, os autores previram, por meio de modelo matemático, que cerca de 60% do transporte da RNT ocorre por via paracelular, o que sugere que outros mecanismos podem estar relacionados aos processos absorptivos deste marcador (BOURDET; POLLACK; THAKKER, 2006).

As comparações entre os resultados de P_{ef} e entre os resultados de P_{ap} na ausência e na presença de VRP demonstraram que o aumento da permeabilidade foi de, no mínimo, 40% quando a P-gp foi inibida, o que reforça ainda mais a significativa interação entre a RNT e a glicoproteína avaliada.

É importante destacar ainda que os valores de P_{ap} obtidos no presente trabalho apresentaram o mesmo perfil gráfico dos resultados de P_{ef} (Figura 3.1). Em outras palavras, o METO é aproximadamente de duas a três vezes mais permeável que a RNT, o que sugere que esse marcador foi prontamente transportado para a circulação sanguínea mesentérica em função do seu mecanismo de transporte por via passiva transcelular.

A avaliação estatística relacionada aos valores obtidos de P_{ef} e de P_{ap} indicou que tanto o METO quanto o METO com o VRP apresentaram diferentes resultados em relação à RNT e à RNT com VRP, o que indica que o método de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico descrito no presente trabalho foi adequado para ser aplicado aos estudos de transporte dos fármacos antirretrovirais, uma vez que tais marcadores foram capazes de diferenciar as características de alta e de baixa permeabilidade na ausência e na presença do inibidor de P-gp.

Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT

Os valores de permeabilidade (P_{ef} e P_{ap}) dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foram calculados de acordo com as Equação 3.1 e Equação 3.4, enquanto que a F_a foi calculada a partir da Equação 3.2. A Tabela 3.3 apresenta os resultados de P_{ef} , de P_{ap} e de F_a para os referidos fármacos na ausência e na

presença de inibidor de P-gp (VRP). Já a Figura 3.2 representa graficamente os valores de permeabilidade. As avaliações estatísticas entre os resultados são mostradas nas Tabela 3.4 e Tabela 3.5.

Tabela 3.3: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de transporte por meio do modelo de perfusão *in situ* na ausência (-) e na presença (+) de inibidor de P-gp VRP. Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).

	(-)		(+))		(-)		(+))	
Fármaco	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$F_a \text{ (%) predita}$	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$F_a \text{ (%) predita}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$		
d4T	4,18±0,34	80	4,41±0,49	82	0,49±0,074	0,51±0,082		
3TC	3,16±0,90	70	4,97±0,58	81	0,23±0,050	0,42±0,067		
AZT	4,37±0,45	81	5,44±0,39	88	0,50±0,031	0,60±0,040		

Figura 3.3: Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores na ausência e na presença de VRP obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado (n=6).

Tabela 3.4: Avaliação estatística dos resultados de P_{ef} na ausência e na presença de VRP, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$.

	METO	METO + VRP	RNT	RNT + VRP	d4T	d4T + VRP	3TC	3TC + VRP	AZT	AZT + VRP
METO		Não	Sim		Sim		Sim		Sim	
METO + VRP				Sim		Sim		Não		Não
RNT				Sim	Sim		Sim		Sim	
RNT + VRP						Sim		Sim		Sim
d4T						Não	Sim		Não	
d4T + VRP								Não		Sim
3TC								Sim	Sim	
3TC + VRP										Não
AZT										Sim
AZT + VRP										

Sim = diferença estatística constatada.

Não = sem diferença estatística.

Tabela 3.5: Avaliação estatística dos resultados de P_{ap} na ausência e na presença de VRP, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$.

	METO	METO + VRP	RNT	RNT + VRP	d4T	d4T + VRP	3TC	3TC + VRP	AZT	AZT + VRP
METO		Não	Sim		Não		Sim		Não	
METO + VRP				Sim		Não		Sim		Não
RNT				Sim	Sim		Não		Sim	
RNT + VRP						Sim		Sim		Sim
d4T						Não	Sim		Não	
d4T + VRP								Não		Não
3TC								Sim	Sim	
3TC + VRP										Sim
AZT										Não
AZT + VRP										

Sim = diferença estatística constatada.

Não = sem diferença estatística.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 3.3) e na avaliação estatística apresentada (Tabela 3.4 e Tabela 3.5), foi possível observar as diferenças entre os resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais. A comparação entre os valores de permeabilidade dos fármacos e dos marcadores permitiu analisar a influência causada pela P-gp sobre a permeabilidade das substâncias. Assim, a Tabela 3.6 apresenta as razões entre a permeabilidade obtida na presença de VRP e a permeabilidade obtida na ausência deste inibidor.

Tabela 3.6: Razões entre os resultados de P_{ef} e entre os resultados de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores empregados nos estudos de perfusão *in situ* na presença e na ausência de VRP.

Fármaco/ Marcador	Razão $P_{ef} \text{ VRP}/P_{ef}$	Diferença estatística	Razão $P_{ap} \text{ VRP}/P_{ap}$	Diferença estatística
METO	0,97	Não	1,09	Não
RNT	1,41	Sim	1,47	Sim
d4T	1,06	Não	1,04	Não
3TC	1,57	Sim	1,82	Sim
AZT	1,24	Sim	1,20	Não

Conforme apresentado na Tabela 3.6, valores de razão próximos de 1 não indicaram diferença estatística entre o resultado obtido na presença do inibidor e o resultado obtido na ausência do mesmo. Em relação aos valores de P_{ef} , o METO e a d4T não apresentaram aumento significativo da permeabilidade quando o VRP foi empregado como inibidor de P-gp. Já em relação aos valores de P_{ap} , o METO, a d4T e a AZT não apresentaram diferenças significativas quando o VRP foi adicionado aos ensaios.

Desta forma, a 3TC apresentou aumento da P_{ef} e da P_{ap} quando o VRP foi acrescentado, o que sugere que este antirretroviral apresenta interação com a P-gp (Tabela 3.3 e Tabela 3.6).

A 3TC apresentou valores de P_{ef} diferentes dos valores obtidos para o METO e para a RNT nos ensaios sem VRP. Entretanto, quando este inibidor foi coperfundido, não houve diferença significativa em relação ao valor de P_{ef} do METO, o que indicou o aumento da permeabilidade da 3TC (Tabela 3.4). Com relação aos resultados de P_{ap} , a 3TC foi pouco absorvida e não houve diferença com o valor de P_{ap} da RNT (Tabela 3.5). Por outro lado, quando o VRP foi acrescentado, foi possível observar o aumento no valor da P_{ap} da 3TC. Porém, neste caso, não houve um aumento significativo da P_{ap} da 3TC em comparação ao METO, o que sugere que outros mecanismos além do transporte de efluxo podem estar envolvidos na absorção deste fármaco.

Os resultados de P_{ef} referentes à AZT demonstrou que este fármaco é diferente do METO e da RNT. Nos ensaios com VRP, foi possível observar que o valor de P_{ef} da AZT aumentou e se aproximou do valor apresentado pelo METO. Entretanto, os resultados de P_{ap} indicaram a proximidade dos valores entre AZT e METO e confirmou a diferença com a RNT.

O resultado de P_{ef} da AZT apontou diferença estatística entre os ensaios conduzidos na presença e na ausência de VRP. A princípio, esta observação levaria a concluir que a AZT apresenta interação com a P-gp, o que poderia explicar seu valor de biodisponibilidade variável (em torno de 66%) (DEZANI et al., 2016; SOARES et al., 2013). Por outro lado, ao observar o valor de P_{ap} , constatou-se que não houve diferença significativa entre os experimentos conduzidos na ausência e na presença de VRP (Tabela 3.6).

Alguns estudos descritos na literatura abordam a possibilidade da AZT ser substrato da P-gp. Em trabalho publicado por Quevedo, Nieto e Briñón (2011), a AZT foi avaliada como substrato de P-gp em segmentos intestinais por meio do modelo de saco invertido. Como resultado, estes autores encontraram evidências da interação entre a AZT e a P-gp, o que limita a absorção deste fármaco (QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011).

Contudo, o elevado valor de P_{ef} e de P_{ap} da AZT (Tabela 3.3 e Figura 3.2) corrobora com seu alto valor de F_a em seres humanos (98%) (ZHU et al., 2002). A comparação com a F_a predita em seres humanos (81% em ensaios sem VRP e 88% em ensaios com VRP) realça as limitações que este fármaco pode sofrer nos processos de transporte.

No caso da AZT, fica evidenciada a diferença constatada quando os resultados de P_{ef} são comparados com os resultados de P_{ap} . Em situações em que o fármaco apresenta diferentes mecanismos de transporte, é possível encontrar diferenças não correspondentes entre P_{ef} e P_{ap} , uma vez que as duas metodologias empregadas (quantificação da substância a partir do perfusato para obter a P_{ef} e quantificação da substância a partir do plasma sanguíneo para obter a P_{ap}) podem resultar em conclusões diferenciadas, embora o modelo de perfusão *in situ* tenha sido executado no mesmo animal sob as mesmas condições experimentais (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017).

É importante destacar ainda que o modelo de perfusão *in situ* baseado apenas na quantificação do fármaco presente no perfusato pode não refletir as

mesmas inferências observadas quando o sangue mesentérico é analisado neste modelo. Isto ocorre devido a diferentes fatores inerentes ao ensaio de perfusão *in situ*. Quando somente o perfusato é analisado, a permeabilidade é baseada apenas na diferença entre as concentrações do fármaco que foi adicionado na porção proximal do segmento intestinal e a concentração do fármaco no momento da coleta da amostra na porção distal (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2016, 2017; VOLPE, 2010).

Os resultados referentes à d4T indicaram o aumento sutil tanto da P_{ef} quanto da P_{ap} deste fármaco quando VRP foi adicionado à solução de perfusão (Tabela 3.3). Entretanto, conforme apresentado na Tabela 3.6, os valores das razões são muito próximos de 1 tanto para a P_{ef} quanto para a P_{ap} . Esta observação, juntamente com a avaliação estatística realizada, reforça que a d4T não apresentou interação significativa com a P-gp. Assim, o mecanismo de efluxo pela atuação deste carreador não está envolvido na biodisponibilidade variável do antirretroviral.

A avaliação da permeabilidade da d4T mostrou que este fármaco apresenta valor de P_{ef} diferente do valor do METO e da RNT tanto nos ensaios com VRP quanto nos ensaios sem este inibidor (Tabela 3.4). Entretanto, a comparação da P_{ap} entre d4T e METO não mostrou diferença significativa nos ensaios com e sem VRP (Tabela 3.5), o que indica a elevada capacidade de permeação deste antirretroviral.

A d4T apresenta F_a em torno de 86% em seres humanos (SY et al., 2015), o que mostra a elevada capacidade deste fármaco em atravessar a parede do TGI. A proximidade dos valores de P_{ap} da d4T com os valores de METO corroboram com esta afirmação.

O mecanismo de transporte da d4T ainda não é totalmente compreendido. Todavia, alguns trabalhos na literatura têm discutido a participação de carreadores, os quais podem limitar a velocidade de permeação da substância. A não influência de P-gp sobre a permeabilidade da d4T sugere que outros fatores relacionados ao transporte deste antirretroviral devem ser avaliados por meio de estudos complementares a fim de que seja possível compreender as causas relacionadas à sua biodisponibilidade incompleta.

A obtenção dos valores das razões apresentados na Tabela 3.6 teve como objetivo demonstrar claramente a relação entre os resultados obtidos. Desta forma, com base nos valores de P_{ef} foi possível observar a 3TC e a AZT apresentaram, no

mínimo, um aumento de 20% da permeabilidade quando o VRP foi utilizado como inibidor de P-gp. Entretanto, a diferença estatística para os valores da P_{ap} da AZT não permitiu concluir sobre esta interação fármaco-carreador de efluxo. Assim, embora a AZT tenha desmonstrado claramente sua interação com a P-gp por meio de estudos conduzidos em modelos *in vitro* e *ex vivo* reportados na literatura, a relevância clínica desta interferência não é importante, uma vez que a alta permeabilidade deste antirretroviral SCBDF classe I acaba contrabalançando os efeitos de efluxo causados pela P-gp (BENET, 2013; DEZANI et al., 2016; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; QUEVEDO; NIETO; BRIÑÓN, 2011).

Avaliação do transporte de efluxo em modelo *in vitro* MDCK-MDR1

Verificação da viabilidade celular

A verificação da viabilidade das células MDCK-MDR1 foi de suma importância para avaliar se as monocamadas formadas nos suportes com filtro permeável estavam adequadas para serem empregadas nos estudos de transporte. Conforme mencionado anteriormente, a faixa de valores descrita para as células MDCK-MDR1 foi baseada na padronização interna e em estudos já relatados na literatura, de modo a garantir a uniformização dos ensaios executados (SOLDNER et al., 2000). A Tabela 3.7 apresenta os valores médios referentes ao TEER para as células MDCK-MDR1 em cada condição experimental (ensaios de transporte bidirecional na ausência e na presença de inibidor de P-gp GG918).

Tabela 3.7: Valores médios da resistência elétrica transepitelial (TEER) obtidos para as monocamadas MDCK-MDR1 empregadas nos estudos de transporte bidirecional na ausência e na presença de GG918 (n=3).

MDCK-MDR1 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)										
d4T			3TC		AZT		METO		RNT	
n	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A
1	1550	1560	1530	1510	1580	1580	1580	1510	1520	1500
2	1530	1530	1580	1510	1530	1560	1550	1550	1560	1600
3	1540	1500	1570	1550	1520	1580	1540	1580	1540	1570
MDCK-MDR1 com GG918 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)										
d4T			3TC		AZT		METO		RNT	
n	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A
1	1521	1590	1560	1540	1560	1520	1560	1500	1500	1500
2	1540	1500	1530	1580	1580	1510	1500	1550	1520	1600
3	1550	1520	1560	1520	1550	1520	1600	1540	1620	1640

De acordo com a Tabela 3.7, os valores de TEER apresentado em todas as condições variaram de 1500 a 1640 Ωcm^2 , o que indica que as monocamadas celulares estiveram viáveis para serem empregadas nos experimentos. Além disso, os valores apresentados não indicaram falhas na formação celular, o que poderia causar a transferência inadequada do fármaco do compartimento doador para o receptor (NAVARRO et al., 2011; SOLDNER et al., 2000). Os dados exibidos demonstraram-se estáveis, com pouca variação entre si. Monocamadas celulares que estiveram fora da faixa preconizada para o ensaio (de 1500 a 2000 Ωcm^2) foram descartadas.

A definição de uma faixa de TEER associada a diferentes ensaios *in vitro* é de grande relevância e não deve ser ignorada, uma vez que este parâmetro indica as condições estruturais e fisiológicas da linhagem celular, o que é importante para

a obtenção de resultados mais fidedignos. Além disso, a confluência de crescimento foi atingida adequadamente para que os experimentos de transporte pudessem ser realizados de maneira apropriada.

Estudo bidirecional de transporte em MDCK-MDR1

Estudos em culturas celulares têm sido amplamente descritos na literatura para avaliar os diferentes mecanismos de transporte que influenciam a absorção de fármacos oralmente administrados (BELOQUI et al., 2013; DE SOUZA et al., 2009; JUNIOR et al., 2015).

No presente estudo, o mecanismo de efluxo pela P-gp foi avaliado para os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT por meio de estudos bidirecionais em monocamadas celulares MDCK-MDR1 na ausência e na presença do inibidor de P-gp GG918.

Além da avaliação do TEER, foram também empregadas substâncias marcadoras de alta e de baixa permeabilidade (METO e RNT, respectivamente) com o propósito de verificar a viabilidade das células nos experimentos de transporte.

Desta forma, os ensaios *in vitro* em células MDCK-MDR1 permitiram obter os valores de permeabilidade aparente (P_{ap}), cujos resultados são apresentados na Tabela 3.8 e na Figura 3.4.

Tabela 3.8: Resultados de P_{ap} e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de transporte bidirecional em MDCK-MDR1 dos fármacos d4T, 3TC e AZT e dos marcadores METO e RNT na ausência e na presença de inibidor de P-gp GG918 (n=3).

$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$				
Sem GG918			Com GG918	
Fármaco/ marcador	A→B	B→A	A→B	B→A
METO	0,93±0,099	0,85±0,031	1,21±0,101	0,63±0,045
RNT	0,01±0,002	0,18±0,040	0,02±0,004	0,02±0,004
d4T	0,05±0,006	0,08±0,004	0,05±0,016	0,04±0,014
3TC	0,01±0,001	0,02±0,002	0,01±0,005	0,01±0,005
AZT	0,07±0,004	0,18±0,047	0,08±0,008	0,05±0,010

Figura 3.4: Representação gráfica dos resultados de P_{ap} referentes ao estudo bidirecional dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores realizado por meio do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 na ausência e na presença de inibidor de P-gp GG918 (n=3).

* diferença estatística significativa quando $p < 0,05$ (comparação entre as direções $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$).

A comparação entre os resultados de P_{ap} apresentados na Tabela 3.8 permitiu obter as razões entre a P_{ap} no sentido $B \rightarrow A$ e a P_{ap} no sentido $A \rightarrow B$ ($P_{ap} B \rightarrow A / P_{ap} A \rightarrow B$), as quais são apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Valores referentes às razões $P_{ap} B \rightarrow A / P_{ap} A \rightarrow B$ dos resultados de permeabilidade obtidos por meio dos experimentos de transporte bidirecional dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores em células MDCK-MDR1 na ausência e na presença de GG918.

Substância	Razão $P_{ap} B \rightarrow A / P_{ap} A \rightarrow B$	
	Sem GG918	Com GG918
METO	0,91	0,52
RNT	18,00	1,00
d4T	1,60	0,80
3TC	2,00	1,00
AZT	2,60	0,62

Os experimentos realizados em modelo *in vitro* MDCK-MDR1 descritos no presente trabalho foram executados com o propósito de avaliar a interação dos fármacos antirretrovirais com o carreador de efluxo P-gp. Todavia, a cultura celular MDCK-MDR1 não é considerada um modelo destinado à avaliação da permeabilidade, uma vez que esta linhagem é transfectada com o gene MDR-1, o qual permite a superexpressão da glicoproteína-P (JUNIOR et al., 2015). Apesar disso, a observação dos resultados de permeabilidade obtidos por meio do modelo MDCK-MDR1 permitiu verificar o comportamento da substância quando esta foi submetida aos estudos bidirecionais descritos no presente trabalho.

Com base na Tabela 3.8 e na Figura 3.4, foi possível verificar que os três fármacos antirretrovirais apresentaram baixos valores de P_{ap} em comparação com o marcador de alta permeabilidade METO tanto no sentido $A \rightarrow B$ quanto no sentido $B \rightarrow A$ na ausência e na presença de GG918. Além disso, esses resultados se aproximaram dos valores encontrados para a RNT, a qual apresenta como principal mecanismo de transporte a via passiva paracelular (KIM et al., 2006; KORTEJÄRVI et al., 2005). Assim, é possível que este mecanismo esteja envolvido nos processos de absorção dos fármacos antirretrovirais estudados.

A participação de diferentes carreadores de influxo, os quais não estão expressos adequadamente nas células MDCK-MDR1, podem justificar a permeabilidade mais elevada dos antirretrovirais encontrada em modelos mais

próximos das condições *in vivo*, conforme os resultados obtidos no presente trabalho por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico (DE SOUZA et al., 2009; DEZANI et al., 2013, 2016; REIS et al., 2013).

Em modelos *in vitro* que empregam células capazes de superexpressar a P-gp como a MDCK-MDR1, é importante considerar que nos estudos bidirecionais o mecanismo de efluxo é evidente para fármacos que são substratos deste carreador. Desta forma, o aumento da permeabilidade no sentido secretório, ou seja, no sentido $B \rightarrow A$, é notório e seu valor é maior que a permeabilidade observada no sentido $A \rightarrow B$ em experimentos sem o inibidor de P-gp.

Baseado nisso, Giacomini e colaboradores (2010) publicaram um trabalho que discute a importância dos mecanismos de efluxo. Assim, quando o valor de P_{ap} no sentido $B \rightarrow A$ é dividido pelo valor de P_{ap} no sentido $A \rightarrow B$, obtém-se o valor da razão entre esses dois resultados, o que representa o quanto o fármaco interage significativamente com a P-gp em cultura celular que superexpressa esta glicoproteína. Logo, quando a razão obtida é igual ou maior que 2, é possível afirmar que a substância avaliada é um substrato deste carreador de efluxo (GIACOMINI et al., 2010). Assim, os resultados apresentados na Tabela 3.8 e os valores das razões $P_{ap} B \rightarrow A / P_{ap} A \rightarrow B$ apresentados na Tabela 3.8 permitiram observar as diferenças entre os experimentos conduzidos bidirecionalmente na ausência e na presença de GG918.

O uso do inibidor GG918 tanto no lado apical quanto no lado basolateral teve como objetivo garantir a inibição da P-gp durante todo o período de experimento. Desta forma, os valores das razões apresentados na Tabela 3.9 mostrou que a inibição da glicoproteína foi eficiente e que somente o transporte passivo transcelular estava disponível para a transferência do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor.

Ainda com base na Tabela 3.8 e na Figura 3.4, os valores de METO foram maiores em todas as situações experimentais (sentidos $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$, na ausência e na presença de GG918). A alta capacidade de permeação deste marcador pode ser constatada e a presença do inibidor não causou influência no transporte desta substância.

Com relação ao marcador de baixa permeabilidade RNT, este apresentou o menor valor de permeabilidade nos ensaios conduzidos sem o inibidor GG918 (Tabela 3.8). Por outro lado, esta substância apresentou elevada razão $B \rightarrow A / A \rightarrow B$

(Tabela 3.9), o que indicou sua interação com a glicoproteína-P. Além disso, sua permeabilidade foi aumentada quando GG918 foi adicionado aos experimentos (Tabela 3.8). O fato da RNT apresentar-se como substrato de P-gp está de acordo com alguns trabalhos sobre mecanismos de efluxo descritos na literatura (BOURDET; POLLACK; THAKKER, 2006; KIM et al., 2006; KORTEJÄRVI et al., 2005).

Quanto aos fármacos antirretrovirais, estes apresentaram diferentes graus de interação com a P-gp. De acordo com a Tabela 3.8 e com a Figura 3.4, os três compostos mostraram aumento dos valores de P_{ap} quando o estudo de transporte foi conduzido na direção secretória sem GG918. Assim, as razões obtidas apresentadas na Tabela 3.9 reflete a magnitude da interação fármaco-P-gp.

Para a d4T, o valor da razão $B \rightarrow A/A \rightarrow B$ foi de 1,6 (Tabela 3.9), o que sugere a fraca interação entre este fármaco e o carreador de efluxo. O aumento da P_{ap} quando a substância foi avaliada no sentido $B \rightarrow A$ não foi estatisticamente relevante em relação à direção $A \rightarrow B$, conforme mostrado na Figura 3.3. Como já mencionado anteriormente, a razão igual ou maior que 2 indica que o fármaco é substrato da P-gp, o que não é possível afirmar para a d4T com base nos resultados obtidos.

A 3TC apresentou razão igual a 2 (Tabela 3.9), o que, segundo Giacomini e colaboradores, a classificaria como substrato de P-gp (GIACOMINI et al., 2010). Na Tabela 3.8, o valor de P_{ap} da 3TC obtido na ausência de GG918 foi semelhante ao valor encontrado para o marcador de baixa permeabilidade RNT na direção $A \rightarrow B$, o que ressalta sua permeabilidade limitada no modelo MDCK-MDR1 (DEZANI et al., 2016).

Já para a AZT, o valor da razão encontrado (razão = 2,6) foi maior que a razão para a 3TC (razão = 2,0), sendo esse fármaco considerado um substrato da P-gp. Além disso, a semelhança entre os valores de P_{ap} da AZT e da d4T sugerem que ambos os fármacos podem possuir mecanismos de transporte semelhantes em função da similaridade encontrada entre seus resultados direção $A \rightarrow B$.

É importante destacar ainda que o valor da razão encontrado para o marcador RNT foi bastante elevado (razão = 18,0), o que está muito acima do limite indicado por Giacomini e colaboradores (2010). Conforme já discutido anteriormente e com base nos resultados obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico descrito no presente trabalho, fica evidenciada a expressiva interação entre esta substância e a P-gp.

Poucos estudos descritos na literatura tratam conclusivamente a respeito dos mecanismos de transporte dos antirretrovirais estudados no presente trabalho. Em experimentos conduzidos por Souza e colaboradores (2009), a 3TC e a AZT foram avaliadas em modelos MDCK, MDCK-MDR1 e Caco-2. Os ensaios foram realizados bidirecionalmente e os resultados demonstraram que ambos os fármacos são fracos substratos da P-gp, embora a AZT tenha apresentado uma razão $B \rightarrow A/A \rightarrow B$ superior a 5 em MDCK-MDR1. No entanto, a faixa de TEER adotada naquele estudo foi diferente (900-1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), o que pode justificar algumas diferenças com os resultados obtidos no presente estudo (DE SOUZA et al., 2009).

Deste modo, os resultados de P_{ap} obtidos em modelo MDCK-MDR1 devem ser analisados em conjunto com os resultados de permeabilidade obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico, para que seja possível compreender os mecanismos envolvidos na absorção dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT.

Modelo de perfusão *in situ* versus modelo *in vitro* MDCK-MDR1

Os resultados obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* e do modelo *in vitro* MDCK-MDR1 descritos no presente trabalho permitiram compreender, com maiores detalhes, os mecanismos envolvidos no transporte dos fármacos d4T, 3TC e AZT.

Embora poucos estudos tenham sido relatados na literatura a respeito dos mecanismos de transporte de tais substâncias, o presente trabalho possibilitou compreender os impactos causados pela P-gp sobre a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais estudados.

A partir da análise dos resultados obtidos por meio dos dois métodos (perfusão *in situ* e MDCK-MDR1), a correspondência entre os valores de P_{ef} e de P_{ap} obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ*, onde os fármacos 3TC e AZT apresentaram interações com a P-gp foi notável. Por outro lado, neste mesmo modelo, o aumento da permeabilidade da d4T quando o VRP foi acrescentado como inibidor de P-gp não foi estatisticamente relevante.

Assim, com base nos resultados obtidos no presente estudo, a d4T foi o antirretroviral que menos interagiu com a P-gp tanto no jejuno de rato quanto no MDCK-MDR1. Já a 3TC e a AZT apresentaram interações mais significativas com a glicoproteína no modelo MDCK-MDR1.

Uma vez que o processo de absorção é complexo, é possível que haja mais do que um único mecanismo de transporte para determinada substância (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; REIS et al., 2013). Desta forma, os resultados de P_{ap} encontrados em MDCK-MDR1 foram baixos e significativamente distantes dos resultados de METO, o que sugeriu que os três antirretrovirais apresentam mecanismo de transporte de influxo, não sendo descartada a via passiva paracelular em menor proporção. O envolvimento de carreadores de influxo pode, até certo limite, justificar a fração absorvida destes fármacos ($\approx 80\%$), uma vez que esse processo constitui um mecanismo saturável, o que pode limitar a absorção dos antirretrovirais estudados.

Alguns estudos de permeabilidade intestinal descritos na literatura apresentam os possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na absorção oral dos fármacos antirretrovirais. Entretanto, a elucidação dos tipos de transporte envolvidos na absorção de fármacos é raramente encontrada na literatura.

CONCLUSÃO

A comparação entre os valores de P_{ef} e entre os valores de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais permitiu identificar o aumento dos resultados de permeabilidade para a d4T, 3TC e AZT. Para a d4T, o aumento nos valores de P_{ef} e de P_{ap} quando o inibidor de P-gp foi empregado não foi o suficiente para apontar uma diferença estatisticamente relevante para as duas condições empregadas nos ensaios de perfusão *in situ*. Ao contrário, para a 3TC e para a AZT o aumento nos valores de P_{ef} foram significativos quando houve comparação entre os ensaios realizados na ausência e na presença de VRP. No entanto, esta observação não foi feita para o resultado de P_{ap} da AZT. Assim, a 3TC apresentou interação significativa com a P-gp enquanto que a AZT não apresentou tal interação.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nos dados descritos na literatura, a d4T apresenta elevada permeabilidade e sua interação com a P-gp não é relevante. Desta forma, outros fatores podem estar envolvidos nos processos de absorção deste fármaco, como o envolvimento de outros tipos de carreadores de influxo e/ou efluxo.

Já a 3TC também apresentou interações com a P-gp. Uma vez que este fármaco possui o menor valor de biodisponibilidade em comparação com os demais antirretrovirais, é possível que o mecanismo de efluxo esteja contribuindo para a biodisponibilidade incompleta observada para este fármaco.

A AZT apresentou maior interação com a P-gp em MDCK-MDR1. No entanto, a elevada F_a deste fármaco reportada na literatura indica que apesar desta interação, este fármaco é prontamente absorvido através da parede do TGI, o que não traria impactos clinicamente. Uma vez que os fármacos antirretrovirais são administrados de maneira crônica e que poderá haver o uso de outros medicamentos no mesmo paciente, foi de suma importância avaliar o impacto da interação fármaco-carreador de efluxo com o objetivo de garantir o uso seguro e eficaz dos medicamentos.

Assim, os fármacos antirretrovirais apresentaram as seguintes ordens de interação com a P-gp: d4T, AZT e 3TC no modelo de perfusão *in situ*, e d4T, 3TC e AZT em MDCK-MDR1. Deste modo, uma vez que o processo de absorção de fármacos ao longo do TGI é complexo, é possível que outros fatores possam estar envolvidos na permeabilidade da 3TC, que poderia justificar seu valor baixo de biodisponibilidade.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

AMIDON, G. L.; SINKO, P. J.; FLEISHER, D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. **Pharmaceutical Research**, 1988.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013.

AVMA. AVMA Guidelines on Euthanasia American Veterinary Medical. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:AVMA+guidelines+on+euthanasia#0>>.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BELOQUI, A. et al. Mechanism of transport of saquinavir-loaded nanostructured lipid carriers across the intestinal barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 115–123, 2013.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BERGGREN, S. et al. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 553–560, 2004.

BOURDET, D. L.; POLLACK, G. M.; THAKKER, D. R. Intestinal absorptive transport of the hydrophilic cation ranitidine: A kinetic modeling approach to elucidate the role of uptake and efflux transporters and paracellular vs. transcellular transport in Caco-2 cells. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1178–1187, 2006.

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, 2015.

COLLETT, A et al. Modulation of the permeability of H₂ receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 1, p. 171–178, 1999.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess and Metabolism. In: **Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models**. [s.l: s.n.]. p. 182–215.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

ERIKSSON, A. H. et al. The intestinal absorption of a prodrug of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 is mediated by PEPT1: In situ rat intestinal perfusion studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1574–1581, 2010.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

ESTUDANTE, M. et al. Effect of P-glycoprotein on the rat intestinal permeability and metabolism of the BDDCS class 1 drug verapamil. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 11, p. 4038–4045, 2013a.

ESTUDANTE, M. et al. Intestinal drug transporters: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1340–56, 2013b.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1336–1342, 1996.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and

Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin – Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 28–33, 1999.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates : Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

KORTEJÄRVI, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ranitidine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 8, p. 1617–1625, 2005.

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1335–44, 2014.

LEE, K. et al. Secretory transport of ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 574–580, 2002.

LI, M. et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 37–45, 2011.

LOPES, M. A. et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1139–1151, 2014.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MOLS, R. et al. Intestinal perfusion with mesenteric blood sampling in wild-type and knockout mice: Evaluation of a novel tool in biopharmaceutical drug profiling. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 6, p. 1334–1337, 2009.

MUDRA, D. R.; BORCHARDT, R. T. Absorption barriers in the rat intestinal mucosa: 1. Application of an in situ perfusion model to simultaneously assess drug permeation and metabolism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4215–4227, 2010.

NAVARRO, C. et al. Influence of polyunsaturated fatty acids on Cortisol transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood – brain barrier in vitro model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 290–299, 2011.

QUEVEDO, M. A.; NIETO, L. E.; BRIÑÓN, M. C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 151–159, 2011.

RATHORE, R. et al. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 374–380, 2008.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SALPHATI, L. et al. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 7, p. 1007–1013, 2001.

SHAH, J. C. Analysis of permeation data: Evaluation of the lag time method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 90, n. 2, p. 161–169, 1993.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

SOLDNER, A et al. Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 1235–1243, 2000.

SUGANO, K. et al. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. **Journal of Biomolecular Screening : the Official Journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 6, n. 3, p. 189–196, 2001.

SUTTON, S. C.; RINALDI, M. T.; VUKOVINSKY, K. E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and ¹⁴C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 3, p. E25, 2001.

SY, S. K. B. et al. Effect of reducing the paediatric stavudine dose by half: A physiologically-based pharmacokinetic model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 413–419, 2015.

TRAPANI, G. et al. Frog intestinal Sac: A new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 12, p. 2909–2919, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. UNITED STATES PHARMACOPEIA39/National Formulary 34. Rockville USP, , 2016.

VOLPE, D. A. Application of method suitability for drug permeability classification. The AAPS journal, v. 12, n. 4, p. 670–678, 2010.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion to rat. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 368–379, 2007.

ZHU, C. et al. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 399–407, 2002.

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO
METABOLISMO INTESTINAL NA PERMEABILIDADE DE
FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS POR MEIO DO
MODELO DE PERFUSÃO *IN SITU***

RESUMO

A adequada absorção oral ocorre quando o fármaco contido em uma forma farmacêutica é capaz de solubilizar-se nos líquidos presentes no trato gastrointestinal (TGI) e, posteriormente, atravessar a parede intestinal com a finalidade de chegar à corrente sanguínea. Desta forma, as características de solubilidade e de permeabilidade são de grande importância para a biodisponibilidade *in vivo* de uma substância administrada por via oral. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que classifica os fármacos em quatro classes distintas de acordo com suas características de solubilidade e de permeabilidade, o que permite auxiliar na predição da absorção *in vivo*, no desenvolvimento de novos fármacos e de novas formulações. Além disso, outra ferramenta que vem ganhando grande notoriedade atualmente é o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF), o qual classifica as substâncias de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Os processos metabólicos, por sua vez, constituem um fator de grande importância, uma vez que estes influenciam diretamente a biodisponibilidade oral de fármacos. Atualmente são conhecidos diferentes sítios de metabolização, sendo o fígado o principal órgão relacionado às etapas de biotransformação de substâncias. Ainda assim, é de suma importância salientar a ocorrência de metabolismo na parede do TGI, uma vez que os enterócitos são capazes de expressar diferentes enzimas que podem representar impactos relevantes nos processos de absorção e, conseqüentemente, na biodisponibilidade *in vivo*. Desse modo, a parede intestinal representa uma barreira bioquímica à absorção de nutrientes e xenobióticos, realizando processos metabólicos em escala considerável em comparação com o fígado. As principais enzimas presentes nos enterócitos pertencem à família CYP3A (CYP3A4 e CYP3A5). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do metabolismo intestinal pela CYP3A na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT). Estas substâncias são amplamente empregadas no tratamento farmacológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) e apresentam variações em relação aos seus valores de biodisponibilidade *in vivo*. O modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico foi empregado no presente estudo e os experimentos foram conduzidos na ausência e na presença de inibidor de CYP3A cetoconazol (KCZ). Ratos machos da linhagem Wistar foram anestesiados e uma porção do jejuno foi canulada para permitir a entrada do fármaco solubilizado na região proximal e a coleta de perfusato a partir da região distal. A veia mesentérica também foi canulada para possibilitar a coleta de amostras de sangue em intervalos de tempo predefinidos. Os resultados demonstraram que os três fármacos antirretrovirais não possuem interação significativa com as enzimas CYP3A presentes no segmento intestinal estudado, uma vez que o emprego do inibidor KCZ não causou aumento dos valores de P_{ef} e de P_{ap} . Assim, embora as enzimas CYP3A não estejam diretamente envolvidas no metabolismo intestinal da d4T, 3TC e da AZT, não é descartada que outros tipos de enzimas, tais como as UGT (UDP-glucuronosiltransferase), possam estar envolvidas nos processos metabólicos na parede intestinal. Desta forma, foi possível concluir que as enzimas CYP3A não correspondem ao fator limitante da absorção dos três fármacos antirretrovirais e a realização de experimentos mais específicos podem contribuir para identificar a ocorrência de metabolismo intestinal pela ação de outros tipos de enzimas.

Palavras-chave: perfusão *in situ*; metabolismo intestinal; CYP3A; absorção oral.

INTRODUÇÃO

A principal rota de administração de medicamentos é a via oral, a qual é muito utilizada para diferentes tratamentos farmacológicos com formas farmacêuticas sólidas. Após a ingestão, é imprescindível que o fármaco contido na forma de dosagem seja capaz de solubilizar-se nos líquidos presentes no trato gastrointestinal (TGI) e, em seguida, ser adequadamente absorvido por meio de um ou mais mecanismos de transporte que ocorre através dos enterócitos. Desta forma, a substância estará disponível para alcançar o sítio de ação a fim de exercer seu efeito terapêutico com segurança e eficácia (REIS et al., 2013; SHUGARTS; BENET, 2009).

Com base nestas etapas, as características de solubilidade e de permeabilidade de um fármaco constituem importantes fatores determinantes da biodisponibilidade oral, embora outros parâmetros estejam também envolvidos. Desta forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que classifica os fármacos em quatro classes diferentes de acordo com a solubilidade e a permeabilidade. Além disso, o SCB contribui para o desenvolvimento de novos fármacos, novas formulações farmacêuticas, na predição da absorção *in vivo* e nos processos de bioisenção (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Embora o SCB tenha sido amplamente utilizado como base para diversos estudos relacionados à caracterização da solubilidade e da permeabilidade de substâncias, este sistema não considera um terceiro fator capaz de influenciar os processos de absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade: o metabolismo intestinal.

Dessa forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto em 2005 por Wu e Benet como uma ferramenta complementar ao SCB. Esse sistema também classifica os fármacos administrados por via oral em quatro classes, de acordo com as características de solubilidade e a extensão de metabolismo (BENET, 2013; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; WU; BENET, 2005).

Assim, os três fatores que influenciam grandemente a absorção oral de fármacos são: solubilidade, permeabilidade e metabolismo. Estas características devem ser consideradas em estudos de desenvolvimento farmacêutico durante as etapas iniciais de descoberta de novas moléculas candidatas a fármacos.

Tanto os ensaios de solubilidade quanto os de permeabilidade são amplamente descritos na literatura. Além disso, tais precedimentos experimentais são apresentados no guia para a bioisenção de fármacos SCB classe I publicada pela *Food and Drug Administration* (FDA) (CDER/FDA, 2000, 2015a).

Para a avaliação da permeabilidade, diferentes modelos experimentais têm sido desenvolvidos com a finalidade de predizer a absorção de fármacos *in vivo*, especialmente após a divulgação do guia da FDA relacionado aos processos de bioisenção. Assim, algumas metodologias têm sido empregadas não somente para caracterizar a permeabilidade de um composto, mas também para compreender os mecanismos de transporte envolvidos e o metabolismo pré-sistêmico que potencialmente influenciam a biodisponibilidade oral (LUO et al., 2013; SJÖGREN et al., 2014).

Embora a ocorrência do metabolismo intestinal seja conhecidamente um relevante fator responsável pela biodisponibilidade incompleta de algumas substâncias, não existem muitos relatos na literatura que investiguem a participação de enzimas presentes nos enterócitos no comprometimento dos processos absorptivos de fármacos oralmente administrados.

A grande dificuldade em conduzir experimentos que identifiquem os sítios metabólicos contribui para a ausência de informações relacionadas ao metabolismo pré-sistêmico de fármacos. Assim, dentre os variados métodos empregados para os estudos de permeabilidade, o modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico permite avaliar se determinadas enzimas expressas na parede do TGI podem influenciar na permeabilidade de diferentes compostos (CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017; SJÖGREN et al., 2014).

Uma vez que o TGI é considerado o maior sítio metabólico extra-hepático, é importante destacar a presença de diferentes tipos de enzimas nos enterócitos. Além disso, a distribuição das mesmas é heterogênea ao longo do intestino (LIN; LU, 2001; SJÖGREN et al., 2014).

A superfamília CYP3A é largamente expressa nos enterócitos e são responsáveis pelo metabolismo oxidativo (fase I). Tais enzimas correspondem à aproximadamente 80% do total de enzimas presentes na parede intestinal, sendo a isoenzima CYP3A4 expressa em maior proporção, seguida da CYP3A5, a qual é mais comumente encontrada nos enterócitos do que nos hepatócitos (PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014; SJÖGREN et al., 2014).

Embora muitos estudos explorem a influência das enzimas CYP3A sobre a biodisponibilidade de substâncias, poucos trabalhos são encontrados em relação ao metabolismo pré-sistêmico intestinal e seu impacto sobre os processos absorptivos, especialmente em relação aos fármacos antirretrovirais (CUMMINS et al., 2003; KRISHNA; KLOTZ, 1994; LIN; LU, 2001; SJÖGREN et al., 2014; YANG et al., 2007).

Fármacos como estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) são extensivamente utilizados no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids). Os dados *in vivo* de biodisponibilidade destas substâncias são variáveis e os fatores relacionados a estas variações são desconhecidos ou inconclusivos. Uma vez que a absorção corresponde a um processo complexo, é possível que fatores relacionados ao transporte de fármaco ou metabolismo possam justificar a biodisponibilidade limitada de tais substâncias (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2013).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do metabolismo pré-sistêmico que ocorre no TGI sobre a permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foram doados pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, SP, Brasil). Metoprolol (METO) e ranitidina (RNT), empregados como marcadores de alta e de baixa permeabilidade, foram doados pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, SP, Brasil).

Acetonitrila e metanol de grau cromatográfico, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e ácido ortofosfórico (H_3PO_4) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultrapurificada foi obtida a partir do sistema de ultrapurificação Milli-Q (Millipore, MA, EUA).

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), manitol, polietilenoglicol 4000 (PEG-4000) e D-glicose foram utilizados no preparo da solução de perfusão nos ensaios de perfusão *in situ* (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007).

Avaliação da influência do metabolismo intestinal pela CYP3A na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais

Previamente à realização dos estudos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico, o protocolo experimental foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), obtendo resposta favorável para a execução dos experimentos (protocolo de aprovação CEUA/FCF/404).

O sangue de ratos doadores foi obtido para ser empregado na reposição do volume coletado de sangue dos animais submetidos aos ensaios de perfusão *in situ*. Para isso, ratos machos da linhagem Wistar foram anestesiados com mistura de cetamina-xilazina por via intramuscular (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003).

A coleta de sangue foi realizada sob condições assépticas por via intracardíaca com seringa contendo anticoagulante CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose e adenina).

Preparo da solução de perfusão

A solução de perfusão utilizada nos experimentos foi preparada de acordo com a seguinte composição: NaCl 48 mM, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 28 mM, NaH₂PO₄ 43 mM, manitol 35 mM, PEG 4000 1g/L e D-glicose anidra 10 mM (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007). Todos os componentes foram completamente solubilizados em água ultrapurificada (Milli-Q) e o pH ajustado para 6,5 com soluções de HCl ou KOH (DEZANI et al., 2016, 2017; ERIKSSON et al., 2010; RATHORE et al., 2008). Logo após, a preparação foi sonicada por 30 minutos.

O fármaco ou o marcador foi acrescentado à solução de perfusão de maneira individualizada e a concentração de cada substância foi definida com base na maior dose prescrita para seu respectivo produto comercial de acordo com a FDA. Dessa forma, a concentração de cada composto foi determinada pela divisão da maior dose pelo volume de 250 mL. Este volume foi considerado a fim de obter a maior concentração possível do fármaco no lúmen intestinal (CDER/FDA, 2000, 2015a; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013). Assim, as concentrações preparadas para cada composto foram: 0,16 mg/mL para a d4T 1,20 mg/mL para a 3TC, AZT e RNT e 0,40 mg/mL para METO (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016).

Para a avaliação da influência do metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ*, o cetoconazol (KCZ) foi utilizado como inibidor de CYP3A na concentração de 50 µM na solução de perfusão contendo o fármaco ou o marcador previamente solubilizado (CHIBA; HENSLEIGH; LIN, 1997; MUDRA; BORCHARDT, 2010).

Ensaio de perfusão *in situ*

Os ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico foram realizados para avaliar a influência do metabolismo intestinal pela CYP3A na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais e foram executados na ausência e na presença do inibidor de CYP3A.

Ratos machos da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus*) com faixa de peso 250-300g foram empregados nos estudos de metabolismo intestinal. Todos

os animais foram fornecidos pelo Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo.

Os ratos foram submetidos a 12 horas de jejum com acesso livre à água. Após este período, os animais foram anestesiados com mistura de cetamina-xilazina nas concentrações de 0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente, por via intramuscular. A manutenção anestésica foi realizada conforme a necessidade com $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ da dose inicial (DEZANI et al., 2016, 2017; LI et al., 2011).

Em seguida, os animais foram acomodados sobre uma superfície aquecida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ para melhor conforto e controle da anestesia (DEZANI et al., 2016, 2017).

Uma incisão na cavidade abdominal foi realizada para permitir o acesso ao jejuno, o qual foi canulado cuidadosamente para permitir a entrada da solução de perfusão na porção proximal. Outra cânula foi inserida na porção distal após 10 cm de distância do acesso anterior, para possibilitar a coleta de amostras de perfusato em intervalos regulares de tempo. O intestino exposto foi mantido úmido com solução fisiológica aquecida a 37°C durante todo o período do experimento (BERGGREN et al., 2004; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; KIM et al., 2006).

Para possibilitar a coleta das amostras de sangue, uma cânula previamente heparinizada foi introduzida na veia mesentérica. Já para a reposição do volume sanguíneo, foi realizado um acesso com cânula heparinizada na veia jugular dos animais submetidos aos experimentos de perfusão *in situ* (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017).

A solução de perfusão isenta de fármaco (branco) foi perfundida por um período aproximado de 30 minutos a um fluxo de 0,5 mL/min com a finalidade de remover o conteúdo luminal do segmento intestinal selecionado para o estudo (DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013).

Após o período de limpeza, a solução de perfusão com o fármaco ou o marcador solubilizado foi perfundida a um fluxo de 0,2 mL/min. Inicialmente, os primeiros 60 minutos corresponderam ao período para que o fármaco ou o marcador entrassem em equilíbrio com a parede intestinal (DAHAN et al., 2010; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

Após o período de equilíbrio, as amostras de perfusato foram coletadas em intervalos de tempo predeterminados (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos). Cada amostra foi obtida em microtubos pesados previamente para permitir a

correção da concentração da substância no lúmen intestinal por meio de cálculos da taxa de fluxo de água (TFA). Todas as amostras foram congeladas a -20°C para posterior análise por método cromatográfico, o qual é descrito no Capítulo 5, item 5.1 (DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

As amostras de sangue, por sua vez, foram coletadas aos 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da veia mesentérica. A reposição do volume sanguíneo, conforme anteriormente mencionado, foi realizada através do acesso na veia jugular.

Os tubos contendo o sangue coletado foram imediatamente centrifugados a 3500 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos e o plasma foi separado e congelado a -20°C até a realização das análises por método cromatográfico, o qual é descrito no Capítulo 5, item 5.2.

Após a coleta de todas as amostras, os ratos foram eutanasiados com injeção intracardíaca de solução saturada de KCl logo após o aprofundamento da anestesia (AVMA, 2007; DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; LI et al., 2011; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Logo após a eutanásia, cada segmento de jejuno utilizado nos estudos de perfusão *in situ* foi removido para verificar o comprimento intestinal que foi perfundido (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013).

Os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados com as soluções de perfusão contendo o fármaco ou o marcador e o inibidor (KCZ) de CYP3A.

Cálculos relacionados aos ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

A permeabilidade efetiva (P_{ef}) foi calculada a partir da Equação 4.1 (DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016, 2017; ERIKSSON et al., 2010; JAIN et al., 2007; KIM et al., 2006; REIS et al., 2013):

$$P_{ef} = - \frac{Q_{entrada}}{A} \times \ln \left(\frac{C_{saída, corrigida}}{C_{entrada}} \right)$$

Equação 4.1

onde: P_{ef} é a permeabilidade efetiva do fármaco ou do marcador; $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada da solução de perfusão; A é a área intestinal ($2\pi RL$) disponível para a absorção, considerando o comprimento (L) e o raio do intestino (R); $C_{saída}$, corrigida corresponde à concentração corrigida do fármaco ou marcador na saída do segmento intestinal; e $C_{entrada}$ é a concentração do fármaco ou marcador na entrada do intestino.

A partir dos resultados de P_{ef} obtidos em ratos, a fração da dose oral absorvida (F_a) em seres humanos foi calculada a partir da Equação 4.2 sugerida por Sugano e colaboradores (2001) (DEZANI et al., 2016, 2017; ESCRIBANO et al., 2012; JUNIOR et al., 2015; SUGANO et al., 2001b).

$$F_a = 1 - \exp(-38450 \times P_{ef, ratos})$$

Equação 4.2

onde: $P_{ef, ratos}$ é a permeabilidade efetiva obtida a partir dos ensaios com ratos empregando o modelo de perfusão *in situ*.

Para realizar a correção da TFA sobre a concentração da substância no perfusato, foi utilizado o método gravimétrico (DEZANI et al., 2016; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001). A TFA foi calculada de acordo com a Equação 4.3 apresentada abaixo:

$$TFA = \left[1 - \left(\frac{Q_{saída}}{Q_{entrada}} \right) \right] \frac{Q_{entrada}}{l}$$

Equação 4.3

onde: Q_{in} corresponde ao fluxo de entrada da solução de perfusão no interior do segmento intestinal; Q_{out} é o fluxo de saída da solução de perfusão em um intervalo de tempo predefinido e l é o comprimento do segmento intestinal selecionado para o estudo.

Para as amostras de sangue coletadas a partir da veia mesentérica, foram calculados os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap}) de acordo com a Equação 4.4:

$$P_{ap} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_{doador}}$$

Equação 4.4

onde: Q corresponde à quantidade acumulada do fármaco que aparece no sangue mesentérico em função do tempo t sob a condição de equilíbrio; A é a área de superfície intestinal disponível para a absorção e C_{doador} é a concentração do fármaco ou marcador na solução de perfusão.

Análise estatística dos resultados

Os resultados de P_{ef} e de P_{ap} obtidos por meio dos modelos de perfusão *in situ* foram comparados estatisticamente por meio da ANOVA (análise de variância) e teste de Tukey. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (DEZANI et al., 2016; REIS et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliação da influência do metabolismo intestinal pela CYP3A na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais

Previamente à aquisição dos resultados de permeabilidade, a taxa de fluxo de água (TFA) foi verificada com a finalidade de avaliar a influência da absorção e da secreção de água que ocorre no TGI durante os experimentos de perfusão *in situ*. Este fenômeno fisiológico ocorre a todo momento no lúmen intestinal e causa variações na concentração da substância submetida ao estudo. Em outras palavras, a secreção de água no lúmen causa diluição da concentração, enquanto que a absorção de água causa o efeito oposto (DEZANI et al., 2017).

Para os estudos descritos no presente trabalho, a correção da TFA foi baseada no método gravimétrico e os valores obtidos são apresentados na Tabela 4.1 para cada substância empregada na ausência e na presença do inibidor de CYP3A (DEZANI et al., 2016, 2017; LUO et al., 2013; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Tabela 4.1: Resultados referentes à TFA ($\mu\text{L/h/cm}$) obtidos para cada fármaco ou marcador empregados nos estudos de metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência (-) e na presença (+) de KCZ (n=6).

Rato	RNT		METO		d4T		3TC		AZT	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
1	2,00	0,83	0,00	-1,25	-0,99	0,00	-2,11	6,67	0,00	1,00
2	-1,00	0,67	1,00	1,74	0,00	-1,18	-0,83	2,00	-1,05	8,75
3	-3,00	0,00	2,35	4,21	1,82	1,90	-0,95	-1,05	-1,90	1,82
4	4,00	0,95	3,00	2,86	0,95	1,74	0,00	0,00	-1,65	0,00
5	1,00	1,00	1,05	1,00	0,83	1,90	2,94	-1,00	0,00	0,00
6	-1,00	1,54	2,00	3,08	0,00	1,05	0,00	0,00	-1,05	1,74

Com base na Tabela 4.1 apresentada, os valores de TFA indicaram a ocorrência de absorção ou secreção de água no TGI durante os experimentos realizados. Assim, valores positivos indicam que houve absorção de água e, portanto, concentração da substância no lúmen intestinal. Por outro lado, valores negativos indicaram a secreção de água e, portanto, diluição da substância presente no lúmen durante os ensaios (DEZANI et al., 2013, 2016; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Devido à absorção e à secreção de água que ocorrem continuamente, é comum encontrar valores variáveis de TFA. Ainda assim, alguns fatores podem interferir em menor ou em maior grau nestes resultados, tais como: tipo de composto estudado, conteúdo luminal, composição, pH e osmolaridade da solução de perfusão. Em estudos descritos na literatura para ensaios de perfusão *in situ* em jejuno, é possível encontrar valores entre -318,40 e 90,0 $\mu\text{L/h/cm}$ (DEZANI et al., 2017; ZAKERI-MILANI et al., 2007).

O emprego do método gravimétrico nos estudos de perfusão intestinal apresenta uma grande vantagem: a não coperfusão de substâncias não absorvíveis que poderiam causar alterações nos estudos de permeabilidade de fármacos, bem como nas metodologias empregadas para a quantificação das amostras (DEZANI et al., 2016; SUTTON; RINALDI; VUKOVINSKY, 2001).

Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos marcadores METO e RNT

Previamente à execução dos experimentos de perfusão *in situ* para avaliar a influência do metabolismo intestinal sobre a permeabilidade dos fármacos antirretrovirais, foram realizados ensaios com os marcadores de alta e de baixa permeabilidade (METO e RNT, respectivamente) com o intuito de verificar a viabilidade e a integridade do segmento intestinal selecionado. A Tabela 4.2 apresenta os valores de permeabilidade (P_{ef} e P_{ap}) e de F_a obtidos no presente estudo para os referidos marcadores na ausência e na presença de inibidor de CYP3A. A Figura 4.1 apresenta graficamente os resultados de permeabilidade.

Tabela 4.2: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos marcadores (METO e RNT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* na ausência (-) e na presença (+) do KCZ. Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).

	(-)		(+))		(-)		(+))	
Marcador	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5}$ (cm/s)	F_a (%) predita	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5}$ (cm/s)	F_a (%) predita	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5}$ (cm/s)		$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5}$ (cm/s)	
METO	5,63±0,47	88	6,63±0,75	92	0,55±0,049		0,67±0,086	
RNT	1,94±0,17	53	2,19±0,20	57	0,17±0,020		0,18±0,029	

Figura 4.1: Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e P_{ap} do METO e da RNT na ausência e na presença do inibidor de CYP3A (KCZ) obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado (n=6).

* quando $p < 0,05$ em relação ao metoprolol.

Conforme apresentado na Tabela 4.2 e na Figura 4.1, o METO apresentou os maiores valores de P_{ef} e de P_{ap} em comparação com a RNT em ambas as condições experimentais (na ausência e na presença de KCZ), o que confirma as características de alta e de baixa permeabilidade de ambos os marcadores. Tal

observação corrobora com dados de F_a do METO e da RNT, os quais apresentam-se em torno de 95% e 50%, respectivamente (BALIMANE; CHONG, 2008; DANELIAN et al., 2000; DEZANI et al., 2016; ZHU et al., 2002).

A comparação estatística entre os resultados de METO e de METO com KCZ demonstrou uma diferença significativa entre as duas condições (Tabela 4.2), o que indica que este marcador apresentou interação com a enzima CYP3A. Logo, o metabolismo intestinal interferiu na P_{ef} e na P_{ap} do METO quando o KCZ foi adicionado à solução de perfusão.

A interação do METO com as enzimas CYP3A foi avaliada por Boralli e colaboradores (2009) por meio de estudos *in vivo* em ratos machos Wistar. A influência desta enzima sobre os parâmetros farmacocinéticos foi investigada por meio de ensaios conduzidos na ausência e na presença de inibidor KCZ. Foi constatado o aumento nos resultados de área sob a curva (ASC) e de concentração máxima (C_{max}) quando o KCZ foi administrado previamente aos animais. Esses dados mostraram que o METO apresentou interações com a enzima CYP3A e sua absorção foi aumentada significativamente quando o inibidor foi empregado, o que corrobora com os valores encontrados nos estudos de perfusão *in situ* descritos no presente trabalho (BORALLI; COELHO; LANCHOTE, 2009).

Assim, embora a interação entre METO e a enzima CYP tenha sido constatada no presente estudo, a elevada F_a descrita na literatura para seres humanos ($F_a = 95\%$) e os valores de F_a preditos (Tabela 4.2, calculados por meio da Equação 4.2) reforçam a elevada permeabilidade deste marcador, que ocorre por via passiva transcelular (IRVINE et al., 1999; ZHU et al., 2002). Entretanto, a biodisponibilidade do METO é baixa, em torno de 40%, devido à elevada extensão de metabolismo (GOODMAN; GILMAN, 2011). Além disso, a taxa de metabolização pré-sistêmica no fígado e no intestino é de 48% e 0,85%, respectivamente (MADANI et al., 1999), o que sugere que o metabolismo intestinal do METO na parede do TGI não é relevante em comparação ao metabolismo hepático, uma vez que a F_a deste marcador não é comprometida.

Com relação aos experimentos com o marcador de baixa permeabilidade, a avaliação estatística dos resultados demonstrou que tanto a RNT quanto a RNT com KCZ são diferentes dos valores apresentados pelo METO e pelo METO com KCZ. Por outro lado, os valores entre RNT e RNT com KCZ não foram diferentes entre si, o que significa que a CYP não interferiu na permeabilidade deste marcador.

A RNT é uma substância pouco permeável e pouco metabolizada (taxa de metabolização menor que 10%). Além disso, esta substância apresenta baixos valores de permeabilidade e de F_a , o que corrobora com seu mecanismo de transporte por via paracelular passiva (ANTUNES et al., 2013; KORTEJÄRVI et al., 2005; LOPES et al., 2014). Assim, a similaridade estatística entre os valores de P_{ef} e entre os valores de P_{ap} da RNT indicou que esta substância não sofre influência pela enzima CYP3A presente nos enterócitos.

Com base nos resultados de P_{ef} e de P_{ap} indicados na Tabela 4.2 e na Figura 4.1, ambos os marcadores foram empregados adequadamente e o modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico apresentou-se apropriado para os estudos de metabolismo intestinal, uma vez que o METO e a RNT foram capazes de diferenciar as características de alta e de baixa permeabilidade na ausência e na presença do KCZ.

Ainda de acordo com a Figura 4.1, o perfil gráfico referente aos resultados de P_{ef} foi similar ao perfil gráfico de resultados de P_{ap} para os dois marcadores. Em outras palavras, os ensaios de perfusão *in situ* conduzidos na ausência e na presença de KCZ demonstraram que a velocidade de transporte do METO foi aproximadamente o triplo da velocidade de transporte apresentada pela RNT (para dados de P_{ef} e de P_{ap}). Esta observação enfatiza ainda mais os mecanismos de transporte dos dois marcadores empregados no presente estudo.

Com base no exposto, o modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico empregado para avaliar a influência do metabolismo intestinal pela CYP3A apresentou-se adequado para ser aplicado aos estudos com os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT.

Determinação da P_{ef} , da P_{ap} e da F_a dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT

Os resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT foram calculados a partir das Equação 4.1 e Equação 4.4. Já a F_a predita para seres humanos foi calculada utilizando a Equação 4.2. A Tabela 4.3 apresenta os resultados de permeabilidade e de F_a referentes aos ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico na ausência e na

presença do inibidor de CYP3A, enquanto que a Figura 4.2 representa graficamente os valores de P_{ef} e de P_{ap} obtidos.

A avaliação estatística entre os resultados foi realizada conforme anteriormente mencionado e as comparações obtidas são apresentadas nas Tabela 4.4 e Tabela 4.5.

Tabela 4.3: Resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos a partir dos ensaios de metabolismo intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* na ausência (-) e na presença (+) de inibidor de CYP3A Também são mostrados os resultados de F_a preditos para seres humanos (n=6).

	(-)		(+))		(-)	(+)
Fármaco	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$F_a \text{ (%) predita}$	$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$F_a \text{ (%) predita}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$	$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$
d4T	4,18±0,34	80	4,12±0,94	79	0,49±0,074	0,47±0,073
3TC	3,16±0,90	70	3,53±0,60	74	0,23±0,050	0,26±0,025
AZT	4,37±0,45	81	4,83±0,43	84	0,50±0,031	0,55±0,093

Figura 4.2: Representação gráfica dos resultados de P_{ef} e de P_{ap} dos fármacos antirretrovirais e dos marcadores na ausência e na presença de KCZ obtidos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. As barras de erro representam os desvios padrão para cada resultado (n=6).

Tabela 4.4: Avaliação estatística dos resultados de P_{ef} na ausência e na presença de KCZ, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$.

	METO	METO + KCZ	RNT	RNT + KCZ	d4T	d4T + KCZ	3TC	3TC + KCZ	AZT	AZT + KCZ
METO		Sim	Sim		Sim		Sim		Sim	
METO + KCZ				Sim		Sim		Sim		Sim
RNT				Não	Sim		Sim		Sim	
RNT + KCZ						Sim		Sim		Sim
d4T						Não	Sim		Não	
d4T + KCZ								Não		Não
3TC								Não	Sim	
3TC + KCZ										Sim
AZT										Não
AZT + KCZ										

Sim = diferença estatística constatada.

Não = sem diferença estatística.

Tabela 4.5: Avaliação estatística dos resultados de P_{ap} na ausência e na presença de KCZ, onde a diferença significativa foi constatada quando $p < 0,05$.

	METO	METO + KCZ	RNT	RNT + KCZ	d4T	d4T + KCZ	3TC	3TC + KCZ	AZT	AZT + KCZ
METO		Sim	Sim		Não		Sim		Não	
METO + KCZ				Sim		Sim		Sim		Sim
RNT				Não	Sim		Não		Sim	
RNT + KCZ						Sim		Não		Sim
d4T						Não	Sim		Não	
d4T + KCZ								Sim		Não
3TC								Não	Sim	
3TC + KCZ										Sim
AZT										Não
AZT + KCZ										

Sim = diferença estatística constatada.

Não = sem diferença estatística.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4.3 e na Figura 4.2, todos os antirretrovirais estudados não apresentaram alterações nos valores de P_{ef} e de P_{ap} quando o KCZ foi adicionado à solução de perfusão.

Já a análise estatística dos resultados, por sua vez, mostrou pequenas diferenças entre os valores de P_{ef} e de P_{ap} obtidos (Tabela 4.4 e Tabela 4.5).

Em relação à P_{ef} (Tabela 4.4), todos os valores referentes aos fármacos antirretrovirais apresentaram-se distantes dos resultados de METO em ambas as condições experimentais (na ausência e na presença de KCZ). O mesmo foi observado em comparação com a RNT. Além disso, a d4T apresentou-se diferente da 3TC mas não da AZT. Porém, quando o inibidor de CYP3A foi adicionado, os valores de P_{ef} entre d4T, 3TC e AZT apresentaram-se próximos. Por outro lado, os resultados da 3TC na ausência e na presença de KCZ foram diferentes dos valores obtidos para a AZT.

Já em relação aos resultados de P_{ap} (Tabela 4.5), tanto a d4T quanto a AZT ficaram próximos dos valores de METO, enquanto que a 3TC apresentou-se distante deste marcador. Porém, a adição de KCZ aos ensaios mostrou que todos os antirretrovirais ficaram distantes do METO. Já a RNT esteve próxima do resultado da 3TC, o que sugere a limitada absorção deste antirretroviral. Por outro lado, este marcador permaneceu distante da d4T e da AZT independente da presença do inibidor de CYP3A. A d4T e a AZT, por sua vez, apresentaram valores de permeabilidade diferentes da 3TC na ausência e na presença de KCZ.

A biodisponibilidade da d4T é de $82 \pm 5\%$ e este fármaco é classificado como SCB classe I e SCBDF classe III. Cerca de 39% da sua forma inalterada é excretada na urina, o que aponta uma significativa metabolização. O presente estudo não indicou a interferência da CYP3A na permeabilidade intestinal da d4T, o que sugere que a metabolização deste fármaco ocorre em outros sítios que não o TGI. Por outro lado, estudos mais específicos que levam à conclusão mais concreta em relação ao metabolismo da d4T não são descritos na literatura (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2011; SILVA et al., 2012).

Em relação à 3TC, esta apresenta um valor de biodisponibilidade por volta de $86 \pm 17\%$, o que é extremamente variável em comparação à d4T. Esse fármaco é excretado de forma inalterada na urina, o que indica a sua baixa taxa de metabolização (cerca de 5 a 10%). Os sítios metabólicos envolvidos não são claros devido ao baixo metabolismo que este fármaco sofre. A 3TC é classificada como SCB classe I ou III e SCBDF classe III. Assim, seu transporte através da parede do TGI parece ser limitado em função da atuação de transportadores e não devido ao metabolismo oxidativo pela CYP3A investigado no presente estudo (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2011; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; STRAUCH et al., 2011).

Já a AZT apresenta o menor valor de biodisponibilidade em comparação à d4T e à 3TC: $63 \pm 10\%$. Esta porcentagem também é altamente variável e uma vez que esse fármaco é pouco excretado na urina sob a forma inalterada (2,8%), sua taxa de metabolização é extremamente elevada, o que permite classificá-la como SCBDF classe I. Entretanto, os dados obtidos no presente estudo não apontaram uma interação significativa nos valores de permeabilidade, o que leva a entender que o processo de absorção através do TGI não é limitado em função da presença de enzimas metabolizadoras CYP3A. Essa observação corrobora com a alta F_a obtida em seres humanos para a AZT (98%) (ZHU et al., 2002) (ZHU et al., 2002). Assim, a elevada taxa de metabolização e o comprometimento da biodisponibilidade deste antirretroviral se deve à ocorrência de metabolismo em outros sítios que não o TGI, o que não estava claro nas informações constantes na literatura (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2011; SOARES et al., 2013).

Assim, embora não tenha sido possível identificar as diferenças estatísticas entre os ensaios conduzidos na ausência e na presença do inibidor de CYP3A, é interessante destacar que entre os resultados de P_{ef} e de P_{ap} de um determinado composto poderá haver diferenças, uma vez que uma metodologia baseia-se na quantificação das substâncias no perfusato enquanto a outra é baseada na quantificação no plasma mesentérico (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017).

Tais diferenças podem ser atribuídas aos variados tipos de mecanismos de transporte, os quais permanecem ativos independente da presença de KCZ na solução de perfusão.

A possibilidade em coletar o sangue mesentérico durante os experimentos de perfusão *in situ* permite avaliar com mais clareza a quantidade de fármaco que realmente foi capaz de atravessar a parede do TGI e alcançar a corrente sanguínea. Desta forma, a avaliação dos fatores interferentes dos processos de absorção, como o metabolismo intestinal, pode ser melhor elucidada, diferentemente de quando os resultados de permeabilidade são obtidos com base na variação da concentração do fármaco contido no perfusato apenas (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2017).

Estudos referentes ao metabolismo intestinal de substâncias não são descritas com muita frequência na literatura. A grande dificuldade em conduzir

experimentos que permitam identificar os sítios metabólicos tem contribuído para a falta de informações mais específicas sobre a importância do metabolismo que ocorre nos enterócitos. Tais ensaios são de grande importância nas etapas iniciais de desenvolvimento de novos fármacos. Assim, a identificação dos sítios metabólicos *in vivo* ainda constitui um desafio para compreender as variações da biodisponibilidade de compostos (LIN; LU, 2001; PEREIRA DE SOUSA; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2014).

De uma maneira geral, a avaliação do metabolismo hepático é mais comum na literatura. Porém, alguns estudos sugerem que a metabolização de substâncias em diferentes sítios no organismo não possui relação, ou seja, o metabolismo que ocorre no fígado pode ou não ocorrer na parede do TGI e vice-versa. Isto se deve a alguns fatores como diferenças na expressão de enzimas presentes em diferentes sítios metabólicos, tipos de isoenzimas, interação entre fármaco e enzima, além de fenômenos como a interação entre carreador de efluxo-enzima com o fármaco (*transporter-enzyme interplay*) (BENET, 2009; HOSEY; CHAN; BENET, 2016).

Conforme apresentado e discutido no presente estudo, embora o METO tenha apresentado interação significativa com a CYP3A no intestino, sua F_a não é comprometida, uma vez que a permeabilidade deste marcador é elevada. Além disso, estudos indicam que o METO não possui interação com a glicoproteína-P (carreador de efluxo), o que evita que esta substância seja constantemente absorvida e secretada no lúmen intestinal, expondo-a com maior frequência à ação das enzimas metabolizadoras (DAHAN; AMIDON, 2009a; MOLS et al., 2009).

Assim, foi possível perceber que o metabolismo oxidativo que ocorre na parede do TGI não interfere na absorção dos fármacos estudados. Entretanto, é de suma importância considerar a presença de outras enzimas, principalmente aquelas envolvidas nos processos de metabolismo de fase II (conjugação), tais como as UDP-glucuronosiltransferases (UGT), as quais estão também presentes nos enterócitos e podem interferir na biodisponibilidade *in vivo*.

CONCLUSÃO

Os experimentos realizados por meio do modelo de perfusão *in situ* permitiram concluir que o metabolismo intestinal oxidativo não é um fator limitante à absorção e, consequentemente, à biodisponibilidade dos três fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT.

Logo, com base nos dados obtidos e nas discussões levantadas, a avaliação do metabolismo oxidativo pela CYP3A no segmento de jejuno submetido aos estudos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico não indicou o envolvimento da enzima CYP3A nos processos de absorção dos três fármacos antirretrovirais. Entretanto, é de suma importância considerar a presença de outros tipos de enzimas, tais como aquelas que realizam conjugação (metabolismo de fase II), as quais também estão presentes na parede do TGI. Assim, o presente estudo permitiu perceber que o TGI não corresponde a um sítio metabólico oxidativo relevante para interferir na biodisponibilidade incompleta dos referidos fármacos. Os valores de F_a da d4T e da 3TC podem sugerir ainda o envolvimento de outros tipos de enzimas, conforme já mencionado, o que implica em estudos complementares e mais complexos para identificar a relevância do impacto do metabolismo intestinal na absorção dos fármacos antirretrovirais.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANTUNES, F. et al. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 4–20, 2013.

AVMA. AVMA Guidelines on Euthanasia American Veterinary Medical. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:AVMA+guidelines+on+euthanasia#0>.

BALIMANE, P. V; CHONG, S. Evaluation of Permeability and P-glycoprotein Interactions: Industry Outlook. **Biopharmaceutics Applications in Drug Development**, p. 101–138, 2008.

BENET, L. Z. The drug transporter-metabolism alliance: Uncovering and defining the interplay. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 6, p. 1631–1643, 2009.

BENET, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34–42, 2013.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 4, p. 519–547, 2011.

BERGGREN, S. et al. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 553–560, 2004.

BORALLI, V. B.; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Influence of quinidine, cimetidine, and ketoconazole on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of metoprolol in rats. **Chirality**, v. 21, n. 10, p. 886–893, 2009.

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a

biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, 2015.

CHIBA, M.; HENSLEIGH, M.; LIN, J. H. Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes: Major role of CYP3A. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 8, p. 1187–1195, 1997.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAHAN, A. et al. High-permeability criterion for BCS classification: Segmental/pH dependent permeability considerations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1827–1834, 2010.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: The role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2009.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSP/IP) approach in the rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DANELIAN, E. et al. SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: Correlation with fraction absorbed in humans. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2083–2086, 2000.

DEZANI, A. B. et al. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

ERIKSSON, A. H. et al. The intestinal absorption of a prodrug of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 is mediated by PEPT1: In situ rat intestinal perfusion studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1574–1581, 2010.

ESCRIBANO, E. et al. Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 472–477, 2012.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. S. The Pharmacological Basis of Therapeutics. [s.l.: s.n.].

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin – Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 28–33, 1999.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

KORTEJÄRVI, H. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ranitidine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 8, p. 1617–1625, 2005.

KRISHNA, D. R.; KLOTZ, U. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 26, n. 2, p. 144–160, 1994.

LI, M. et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 37–45, 2011.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 535–567, 2001.

LOPES, M. A. et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1139–1151, 2014.

LUO, Z. et al. Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 208–216, 2013.

MADANI, S. et al. Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 8, p. 1199–1205, 1999.

MOLS, R. et al. Intestinal perfusion with mesenteric blood sampling in wild-type and knockout mice: Evaluation of a novel tool in biopharmaceutical drug profiling. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 6, p. 1334–1337, 2009.

MUDRA, D. R.; BORCHARDT, R. T. Absorption barriers in the rat intestinal mucosa: 1. Application of an in situ perfusion model to simultaneously assess drug permeation and metabolism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4215–4227, 2010.

PEREIRA DE SOUSA, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome it **Journal of Controlled Release**, 2014.

RATHORE, R. et al. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 374–380, 2008.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SILVA, A. L. L. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Stavudine **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2012.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 99–151, 2014.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

STRAUCH, S. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Lamivudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011.

SUGANO, K. et al. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. **Journal of Biomolecular Screening: the Official Journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 6, n. 3, p. 189–196, 2001.

SUTTON, S. C.; RINALDI, M. T.; VUKOVINSKY, K. E. Comparison of the gravimetric, phenol red, and ¹⁴C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 3, p. E25, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. UNITED STATES
PHARMACOPEIA39/National Formulary 34. Rockville USP, , 2016.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

YANG, J. et al. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 7, p. 676–684, 2007.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion to rat. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 368–379, 2007.

ZHU, C. et al. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 399–407, 2002.

CAPÍTULO 5: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGADO NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PERFUSATO OBTIDAS POR MEIO DO MODELO DE PERFUSÃO *IN SITU*

RESUMO

Um fármaco administrado por via oral deverá apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade no trato gastrointestinal (TGI) para que a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade ocorram de maneira adequada. Com base na solubilidade e na permeabilidade, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que permite a classificação de fármacos em quatro classes. Outro fator de grande relevância é o metabolismo, o qual ocorre significativamente na parede dos enterócitos. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto como uma ferramenta complementar ao SCB e classifica os fármacos de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Assim, o crescente número de estudos biofarmacêuticos estimulou o desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos ao longo dos anos, especialmente após o estabelecimento dos sistemas SCB e SCBDF. O presente trabalho teve como objetivo apresentar o desenvolvimento e validação do método cromatográfico empregado nos estudos de permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal realizados por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos para quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT). Para isso, um método simples de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE) com detecção em UV foi desenvolvido visando a quantificação das amostras de perfusato contendo os referidos fármacos. A didanosina (ddI) foi empregada como padrão interno (PI). Os seguintes parâmetros foram avaliados: precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade e seletividade. O método apresentou-se adequado, uma vez que todos os parâmetros estiveram de acordo com o preconizado pelo ICH e pela ANVISA. Para cada fármaco, os valores de LD foram: 2,39 µg/mL para a 3TC; 0,32 µg/mL para a d4T e 3,65 µg/mL para a AZT. Já os valores de LQ foram: 7,26 µg/mL para a 3TC; 0,98 µg/mL para a d4T e 11,06 µg/mL para a AZT. A repetibilidade e a precisão intermediária variaram de 1,05 a 1,31 e 1,50 a 1,87, respectivamente, e foram expressos como porcentagem do desvio padrão relativo (DPR). Com base nestes resultados, o método desenvolvido e validado em FR-CLAE apresentou-se adequado para ser empregado na quantificação dos fármacos antirretrovirais (3TC, d4T e AZT) contidos em amostras de perfusato provenientes dos estudos de perfusão *in situ* em ratos. Assim, as condições cromatográficas estabelecidas no presente estudo podem ser aplicadas no desenvolvimento de novos métodos destinados à quantificação de fármacos antirretrovirais, uma vez que, na prática clínica, tais substâncias são administradas concomitantemente.

Palavras-chave: antirretrovirais; CLAE; efluxo; metabolismo; perfusão *in situ*; permeabilidade.

INTRODUÇÃO

Os fármacos antirretrovirais são amplamente utilizados para o tratamento da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Atualmente, estas substâncias são divididas em seis classes: inibidores de protease (IP); inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNAN), inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRAN), inibidores de fusão (IF), inibidores de entrada (IE) e inibidores da integrase (II) (AIDSINFO, 2017).

Os ITRAN são profármacos e a etapa de fosforilação intracelular é indispensável para que estas substâncias se tornem ativas no organismo. A lamivudina (3TC), a estavudina (d4T) e a zidovudina (AZT) são alguns exemplos de fármacos pertencentes à esta classe (BALIMANE; SINKO, 1999; SOARES et al., 2013; STRAUCH et al., 2011).

Uma vez administrados oralmente, os fármacos necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade no trato gastrointestinal (TGI) para que a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade ocorram adequadamente. Assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que considera a solubilidade e a permeabilidade na classificação de substâncias (AMIDON et al., 1995).

A agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) publicou um guia voltado aos processos de bioisenção de fármacos classe I. Assim, medicamentos que contenham fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis podem ser candidatos à bioisenção, o que reduz os custos e a exposição de voluntários sadios aos estudos clínicos de biodisponibilidade e/ou bioequivalência (CDER/FDA, 2000, 2015a).

Desta forma, diferentes estudos de permeabilidade têm sido desenvolvidos desde a implantação do guia da FDA. Logo, a avaliação da permeabilidade de fármacos pode ser realizada por meio de diferentes modelos, sejam eles *in vitro*, *ex vivo* ou *in situ*. Portanto, existe ainda a grande necessidade do desenvolvimento de métodos cromatográficos capazes de permitir a quantificação de substâncias presentes nas amostras obtidas a partir desses estudos (AMIDON et al., 1995; CDER/FDA, 2000, 2015a).

Dentre os diferentes métodos empregados nos estudos de permeabilidade, o modelo de perfusão *in situ* em ratos é amplamente utilizado na avaliação da permeabilidade de fármacos oralmente administrados. Mais recentemente, os

estudos de transporte de efluxo e metabolismo também têm sido descritos para este modelo (CDER/FDA, 2000; DEZANI et al., 2016, 2017; REIS et al., 2013).

Embora alguns métodos analíticos e bioanalíticos possam ser encontrados na literatura em relação à quantificação de fármacos antirretrovirais, tais metodologias estão frequentemente voltadas para os estudos farmacocinéticos e de bioequivalência. Assim, não há ainda um método descrito para a quantificação de amostras provenientes de estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* que contenham 3TC, d4T e AZT (KANO et al., 2005; VERWEIJ-VAN WISSEN; AARNOUTSE; BURGER, 2005).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo apresentar o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico simples e preciso de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE) com detecção em UV para a quantificação dos fármacos 3TC, d4T e AZT contidos em amostras de perfusato oriundos de estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil) e a Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil) forneceram generosamente os padrões de referência e os fármacos 3TC, d4T, AZT e didanosina (ddl). Metanol e acetonitrila de grau cromatográfico, bem como o fosfato de potássio monobásico e o ácido ortofosfórico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapurificada foi obtida a partir do sistema de ultrapurificação Milli-Q® (Millipore, MA, EUA).

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), manitol, polietilenoglicol-4000 (PEG-4000) e D-glicose foram empregados no preparo da solução de perfusão para os estudos de perfusão *in situ* em ratos (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007).

Instrumentação e condições cromatográficas

O sistema CLAE da Merck-Hitachi LaChrom® (EUA) equipado com bomba (L-7100), injetor automático (L-7200), forno de coluna (L-7300), detector ultravioleta (L-7400) e degaseificador (L-7612) foi utilizado para todas as análises cromatográficas. A conexão entre todos os componentes do sistema e o software foi realizada pela interface D-7000 para coleta e processamento dos dados (versão 4.1, 1994-2001, P/N 810866201).

Uma coluna Phenomenex® C18 (150 mm x 4,6 mm X 5 μm) foi utilizada como fase estacionária juntamente com uma pré-coluna Phenomenex® C18 (4 mm x 3 mm). A fase móvel isocrática consistiu de uma mistura de tampão fosfato (20 mM), acetonitrila e metanol na razão de 90:7:3 (v/v/v, %) e o pH foi ajustado a 4,5 com ácido ortofosfórico. O comprimento de onda para detecção em UV foi ajustado para 270 nm. As corridas cromatográficas foram realizadas sob fluxo constante de 0,7 mL/min e volume de injeção de 30 μL . A temperatura do forno da coluna foi programada para manter 35°C.

Métodos

As condições cromatográficas empregadas no presente estudo foram baseadas no trabalho publicado por Kano e colaboradores (2005), onde apenas a 3TC foi quantificada a partir de amostras de plasma sanguíneo humano e a d4T foi empregada como padrão interno (KANO et al., 2005). Assim, o desenvolvimento e validação do método cromatográfico descrito no presente trabalho levou em consideração a possibilidade de quantificar os três fármacos antirretrovirais (3TC, d4T e AZT) a partir de amostras de perfusato provenientes dos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ*.

Estudo de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos

A avaliação da permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais foi realizada por meio do modelo de perfusão *in situ* em ratos machos Wistar. A solução de perfusão foi preparada com NaCl (48 mM), KCl (5,4 mM), Na₂HPO₄ (28 mM), NaH₂PO₄ (43 mM), manitol (35 mM), PEG-4000 (1 g/L) e D-glicose (10 mM). Todos os componentes foram completamente solubilizados em água ultrapurificada (Milli-Q®) e o pH foi ajustado para 6,5 (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; REIS et al., 2013).

A concentração dos fármacos na solução de perfusão foi baseada a partir da dose máxima prescrita dividida em 250 mL (CDER/FDA, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; KIM et al., 2006). Assim, a concentração final de cada substância na solução de perfusão foi: 1,20 mg/mL para 3TC; 0,16 mg/mL para d4T; 1,20 mg/mL para AZT (AIDSINFO, 2017; DEZANI et al., 2016).

Todos os ensaios realizados em animais seguiram o protocolo experimental descrito por Dezani e colaboradores (2016). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) e acondicionados sobre uma superfície aquecida a 37±1°C. Uma porção de 10 cm do jejuno foi canulada em ambas as extremidades e a solução de perfusão sem o fármaco (branco) foi perfundida a 0,5 mL/min com a finalidade de remover quaisquer resíduos alimentares que possam

estar presentes no lúmen intestinal. Em seguida, a solução de perfusão contendo o fármaco solubilizado (3TC, d4T ou AZT) foi perfundida no interior do intestino a um fluxo de 0,2 mL/min por 120 minutos. As coletas das amostras foram realizadas a cada 15 minutos (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos) a partir da porção distal do jejuno. Todas as amostras foram imediatamente armazenadas em congelador a -20 °C até a realização das análises por CLAE (DEZANI et al., 2016).

É importante destacar que os procedimentos descritos para os estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* foram também realizados considerando os estudos de transporte de efluxo e metabolismo intestinal. Para isso, foram adicionados à solução de perfusão o inibidor de glicoproteína-P (verapamil) e o inibidor de enzimas CYP3A (cetoconazol) nas concentrações de 200 e 50 µM, respectivamente.

O preparo das amostras de perfusato foi realizado da seguinte maneira: 150 µL de amostra, 150 µL de solução ddi PI (125 µg/mL) e 1200 µL de fase móvel. A mistura foi homogeneizada e, em seguida, analisadas por CLAE sob as condições cromatográficas já descritas anteriormente.

As análises das amostras de perfusato permitiram obter os resultados de permeabilidade efetiva (P_{ef}), a qual pode ser calculada de acordo com a Equação 5.1 (DEZANI et al., 2016, 2017):

$$P_{ef} = -\frac{Q_{entrada}}{A} \times \ln\left(\frac{C_{saída, corrigida}}{C_{entrada}}\right)$$

Equação 5.1

onde: P_{ef} é a permeabilidade efetiva em cm/s; $Q_{entrada}$ é o fluxo de entrada da solução de perfusão em mL/min; A é a área intestinal ($2\pi rl$) disponível para absorção considerando o raio (r) e o comprimento (l); $C_{saída, corrigida}$ é a concentração corrigida do fármaco na saída do segmento intestinal canulado; e $C_{entrada}$ é a concentração do fármaco na entrada do segmento intestinal canulado.

Soluções padrão estoque (SPE)

O preparo da cada solução padrão estoque (SPE) foi realizada de acordo com as seguintes concentrações: 2,5 mg/mL para a d4T e 6,25 mg/mL para a 3TC e AZT. Posteriormente, estas soluções foram sucessivamente diluídas para permitir a obtenção das soluções padrão de trabalho (SPT) em diferentes níveis de concentração.

Soluções padrão de trabalho (SPT)

As soluções padrão de trabalho (SPT) foram obtidas a partir das diluições sucessivas das SPE. Assim, as faixas de concentração considerada para cada fármaco foi: 0,5-50 µg/mL para d4T; 10-200 µg/mL para 3TC e 10-200 µg/mL para AZT. Todas as SPT foram utilizadas na construção das curvas analíticas para o desenvolvimento e validação do método cromatográfico em CLAE.

Validação do método cromatográfico em CLAE

A validação do método cromatográfico em CLAE foi realizada de acordo com as preconizações descritas pelo ICH e pela ANVISA (ICH, 2005; BRASIL, 2003; BRASIL, 2012). Nos experimentos, o perfusato sem fármaco (branco) foi recolhido a partir da porção distal do jejuno canulado e esta solução foi utilizada para avaliar a existência de picos extras nos tempos de retenção dos fármacos nos cromatogramas.

Os parâmetros de validação considerados para este trabalho incluíram: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e seletividade. A linearidade foi avaliada por meio da comparação entre a área do pico obtida no cromatograma e a concentração do fármaco na SPT. LD corresponde à menor concentração de fármaco que pode ser detectada pelo instrumento e seu valor é equivalente a três vezes o ruído da linha de base. LQ é a concentração mais baixa do fármaco que pode ser quantificada com precisão e exatidão e seu valor é equivalente à relação sinal-ruído superior a 10:1 (ICH, 2005; RUSSO, BARBATO, GRUMETTO, 2016; BRASIL, 2003).

Para a avaliação da exatidão, foram estabelecidos três níveis de concentração diferentes para cada fármaco: concentração alta, média e baixa. Assim, para a 3TC foram considerados 25 µg/mL (baixa), 125 µg/mL (média) e 150 µg/mL (alta). Para d4T foram considerados 1 µg/mL (baixa), 20 µg/mL (média) e 30 µg/mL (alta). Já para a AZT foram considerados 25 µg/mL (baixa), 125 µg/mL (média) e 150 µg/mL (alta). Os valores da área dos picos correspondentes a cada fármaco foram comparados com a concentração nominal.

A exatidão foi calculada de acordo com a Equação 5.2:

$$Exatidão (\%) = \frac{C_d}{C_t} \times 100$$

Equação 5.2

onde: C_d é a concentração do fármaco (d4T, 3TC ou AZT) determinada experimentalmente e C_t é a concentração teórica do fármaco (d4T, 3TC ou AZT).

A precisão do método foi verificada por determinação de três níveis de concentração no mesmo dia (repetibilidade) e em dias consecutivos (precisão intermediária). Este parâmetro foi calculado a partir da Equação 5.3:

$$DPR (\%) = \frac{DP}{C_m} \times 100$$

Equação 5.3

onde: DPR corresponde ao desvio padrão relativo; DP é o desvio padrão e C_m é a concentração média.

A precisão intermediária foi realizada por meio da análise das amostras com analistas diferentes, em dias diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Uma vez que a parede intestinal apresenta uma camada de muco e o lúmen pode conter resíduos alimentares, é necessário o desenvolvimento de um método de quantificação simples, preciso e exato para possibilitar a análise de fármacos contidos no fluido intestinal. No modelo de perfusão *in situ*, o perfusato pode conter impurezas que podem interferir consideravelmente nas análises. Por outro lado, como o tecido intestinal permanece viável durante todo o período de ensaio, não há muitos detritos nas amostras devido à baixa manipulação do jejuno (DEZANI et al., 2017).

Os parâmetros analisados para a validação do método cromatográfico foram: seletividade, linearidade, LD e LQ, precisão e exatidão (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). Os resultados obtidos foram apresentados como média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

A seletividade do método para 3TC, d4T e AZT foi avaliada por meio da observação dos cromatogramas obtidos a partir da solução de perfusão em branco e a partir da SPT contendo o fármaco solubilizado. As análises cromatográficas não demonstraram interferências nos tempos de retenção das substâncias avaliadas, conforme apresentado na Figura 5.1.

Figura 5.1: Cromatogramas obtidos por CLAE correspondentes ao perfusato branco (A), perfusato com os fármacos antirretrovirais e o PI (B), perfusato com verapamil (C) e perfusato com cetoconazol (D). A detecção foi obtida em UV com comprimento de onda de 270nm.

Conforme apresentado na Figura 5.1, os cromatogramas obtidos mostraram que o método desenvolvido foi seletivo para d4T, 3TC e AZT contidos na solução de perfusão. Os tempos de retenção para cada substância foram: 4,8 minutos para 3TC; 7,8 minutos para d4T; 28,6 minutos para AZT e 6,6 minutos para ddl. Não foram observados picos adicionais e o perfusato branco, o verapamil e o cetoconazol não causaram interferências significativas nos cromatogramas obtidos.

Embora a obtenção de cada cromatograma demore 32 minutos (Figura 5.1), os três fármacos antirretrovirais (3TC, d4T e AZT) foram separados eficientemente

na mesma corrida cromatográfica, ao contrário do que é descrito na literatura. Desta forma, o método em CLAE desenvolvido permitiu economizar tempo na etapa de quantificação das substâncias.

O procedimento de preparo das amostras permitiu obter um bom resultado e uma boa resolução dos picos cromatográficos. Em comparação com métodos descritos na literatura, em que matrizes mais complexas são utilizadas, a etapa de preparo das amostras envolve normalmente processos de extração antes de realizar as análises em CLAE, o que torna o procedimento mais caro e laborioso. Como consequência, alterações na recuperação do fármaco podem ser notadas (AYMARD et al., 2000).

As curvas analíticas foram baseadas nas SPT preparadas a partir da diluição da sua correspondente SPE. A Tabela 5.1 apresenta os resultados referentes aos parâmetros considerados na validação do método cromatográfico por CLAE para cada fármaco antirretroviral. Uma boa repetibilidade e uma boa precisão intermediária foram obtidas.

Tabela 5.1: Resultados referentes aos parâmetros cromatográficos considerados na validação do método analítico em CLAE com detecção em UV para os fármacos 3TC, d4T e AZT.

Parâmetro	3TC	d4T	AZT
Faixa de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	10-200	0,5-50	10-200
Inclinação	0,0186	0,2255	0,0160
Intercepto	0,0118	-0,0307	0,0174
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9997	0,9998	0,9998
Repetibilidade DPR* (%)	1,31	1,05	1,07
Precisão intermediária DPR* (%)	1,87	1,56	1,50
Exatidão (%)	100,97	102,38	101,41
Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)	2,39	0,32	3,65
Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	7,26	0,98	11,06

* Os valores de DPR (desvio padrão relativo) são os valores médios correspondentes a três níveis de concentração para cada fármaco (25 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$ para 3TC; 1 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$ para d4T; e 25 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$ para AZT).

O LD do método cromatográfico foi avaliado com base no desvio padrão da resposta e da inclinação (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). De acordo com a Tabela 5.1, os valores foram inferiores a 3,65 µg/mL para todos os fármacos. A reprodutibilidade e a linearidade foram avaliadas por meio de injeções em triplicata das SPT dos fármacos. A linearidade foi verificada com base na área do pico relacionada com sua correspondente concentração.

Conforme apresentado na Tabela 5.1, as curvas analíticas para todas as substâncias testadas foram lineares, variando do menor intervalo de 0,5-50 µg/mL para d4T ao maior intervalo de 10-200 µg/mL para 3TC e AZT. Além disso, os valores de coeficiente de correlação (r^2) para todos os fármacos antirretrovirais avaliados foram maiores que 0,999. Já a repetibilidade e a precisão intermediária foram inferiores a 1,9% para todas as concentrações das curvas analíticas consideradas no presente estudo.

A coluna Phenomenex® C18 empregada nos processos de validação descritos demonstrou uma boa estabilidade, a qual foi demonstrada através dos tempos de retenção e das áreas dos picos, os quais permaneceram inalterados.

A determinação cromatográfica simultânea dos fármacos antirretrovirais contidos em amostras de perfusato é simples de ser realizada em comparação com a quantificação em plasma ou em soro sanguíneo. Além disso, a técnica de preparo das amostras foi simples, limpa e econômica em relação aos outros tipos de matrizes biológicas. O cuidado no preparo da solução de perfusão é extremamente importante para os estudos de perfusão *in situ*, uma vez que qualquer componente pode interferir nos cromatogramas durante os experimentos, o que pode levar a problemas nos parâmetros de validação avaliados, tais como seletividade, precisão e exatidão.

As amostras provenientes de estudos de permeabilidade devem permitir que substâncias pouco permeáveis possam ser quantificadas por um método analítico adequado, tal como a CLAE. Desta forma, o LQ indica que o método cromatográfico é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de fármacos. Além disso, as amostras de perfusato apresentam poucas diferenças de concentração entre elas, principalmente quando fármacos pouco permeáveis são analisados. Neste caso, o método cromatográfico deverá ser capaz de detectar pequenas variações

de concentração, o que é assegurado pelos parâmetros LD, LQ e sensibilidade do método (PATIL et al., 2012).

Aplicação do método cromatográfico na quantificação das amostras de perfusato

O método cromatográfico FR-CLAE, após desenvolvimento e validação adequados, foi empregado na quantificação dos fármacos 3TC, d4T e AZT contidos nas amostras de perfusato obtidas a partir dos ensaios de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ*. Após as análises cromatográficas, os resultados de P_{ef} para cada substância foram calculados com base na Equação 5.1 apresentada anteriormente. A Tabela 5.2 apresenta os resultados de P_{ef} para cada fármaco avaliado nos estudos de permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal, na ausência e na presença de inibidores (verapamil para ensaios de efluxo e cetoconazol para ensaios de metabolismo).

Tabela 5.2: Resultados (n=6) de P_{ef} para 3TC, d4T e AZT e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos para cada condição experimental realizada no modelo de perfusão *in situ* (permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal).

$P_{ef} \pm DP \times 10^{-5} \text{ cm/s}$			
Fármaco	Sem inibidor	Com verapamil	Com cetoconazol
3TC	3,16 $\pm$ 0,90	4,97 $\pm$ 0,58	3,53 $\pm$ 0,60
d4T	4,18 $\pm$ 0,34	4,41 $\pm$ 0,49	4,12 $\pm$ 0,94
AZT	4,37 $\pm$ 0,45	5,44 $\pm$ 0,39	4,83 $\pm$ 0,43

De acordo com a Tabela 5.2, os resultados de P_{ef} mostraram-se próximos entre eles, o que indica a eficiência na obtenção dos resultados adquiridos por meio do método cromatográfico descrito no presente trabalho.

Além disso, os estudos de permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal dos fármacos antirretrovirais permitiram obter resultados semelhantes daqueles descritos na literatura. Assim, um método cromatográfico

possibilita a obtenção de resultados confiáveis e passíveis de comparação entre eles.

Conforme brevemente mencionado, o método analítico descrito no presente trabalho foi baseado no estudo descrito por Kano e colaboradores (2005) (KANO et al., 2005). Entretanto, fármacos antirretrovirais são amplamente empregados em associação na prática clínica, o que exige o desenvolvimento de um método cromatográfico adequado e eficiente que permita a quantificação de substâncias diferentes na mesma matriz.

Em comparação com outros métodos descritos na literatura relacionados à quantificação de fármacos antirretrovirais, o perfusato necessita de um procedimento simples para possibilitar o preparo de amostras. Neste caso, a centrifugação e a filtração são os métodos mais fáceis e econômicos, o que torna a preparação menos trabalhosa para os estudos de permeabilidade. Além disso, o perfusado não apresenta muitas impurezas, o que permite economizar tempo e recursos (DEZANI et al., 2016; ZAKERI-MILANI et al., 2005).

Com relação ao preparo de amostras, metodologias mais complexas são normalmente empregadas para matrizes biológicas. Para o plasma, a precipitação e a extração em fase sólida são os procedimentos mais utilizados, o que envolve maiores custos e maior tempo dedicado ao processo. Além disso, é importante destacar ainda que tais procedimentos causam variações na recuperação devido à presença de resíduos na matriz, o que pode causar elevado sinal do ruído nos cromatogramas. Assim, a compra de solventes e cartuchos para extração em fase sólida deve ser considerada como um custo adicional relacionado aos métodos cromatográficos. Já para as análises feitas a partir de amostras de urina, é importante destacar que os procedimentos são demorados, os cromatogramas podem apresentar elevado ruído de base e o custo de análise é elevado.

Para muitos fármacos, diferentes estudos são realizados em animais e em seres humanos com a finalidade de obter informações sobre a sua biodisponibilidade e farmacocinética, os quais envolvem procedimentos invasivos e questões éticas. Em alguns casos, tais estudos não são suficientes para compreender os processos de absorção de substâncias oralmente administradas. Assim, vários estudos de permeabilidade têm sido desenvolvidos desde o estabelecimento dos sistemas de classificação e o modelo de perfusão *in situ* constitui o método mais próximo das condições *in vivo* (DEZANI et al., 2016, 2017).

O método cromatográfico descrito neste trabalho mostrou algumas vantagens sobre os demais publicados. A ddl é empregada como PI, uma substância comercialmente disponível e que possui estrutura química semelhante aos fármacos estudados. Métodos cromatográficos em CLAE com detecção UV são possíveis de serem executados em um grande número de laboratórios, o que permite facilmente a implementação das condições empregadas. Além disso, o método desenvolvido e validado descrito no presente trabalho foi capaz de fornecer uma boa resposta com baixo custo para a quantificação dos fármacos 3TC, d4T e AZT contidos em amostras de perfusato.

CONCLUSÃO

Um método simples de FR-CLAE com detecção em UV foi desenvolvido e validado para a quantificação de amostras de perfusato contendo os fármacos antirretrovirais 3TC, d4T e AZT.

Os procedimentos empregados no método cromatográfico foram facilmente executados, permitindo que a metodologia seja aplicada nas rotinas diárias em estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* e outros modelos semelhantes como uma ferramenta padronizada para análises. Além disso, este método pode ser utilizado como um protocolo de início para o desenvolvimento de outros métodos semelhantes para a quantificação de fármacos antirretrovirais.

O método cromatográfico apresentado neste estudo foi desenvolvido e validado de acordo com as preconizações do ICH e da ANVISA e demonstrou ser eficaz e adequado para a quantificação dos antirretrovirais contidos nas amostras de perfusato, o que permitiu economizar o tempo dedicado à preparação de amostras e à aquisição dos resultados.

REFERÊNCIAS

AIDSINFO. FDA-Approved HIV Medicines. Disponível em: <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANVISA/BRASIL. Resolução n 899 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da União, v. 29 de maio, 2003.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diário oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

AYMARD, G. et al. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 744, n. 2, p. 227–240, 2000.

BALIMANE, P. V.; SINKO, P. J. Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 39, n. 1–3, p. 183–209, 1999.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CDER/FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. May, 2015.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPIP) approach in the rat. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, v. 4, n. November 2005, 2005.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

KANO, E. K. et al. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, n. 1–2, p. 73–79, 2005.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

PATIL, S. R. et al. Validated HPLC Method for Concurrent Determination of Antipyrine, Carbamazepine, Furosemide and Phenytoin and its Application in Assessment of Drug Permeability through Caco-2 Cell Monolayers. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, n. 1, p. 89–100, jan. 2012.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

STRAUCH, S. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Lamivudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011.

VERWEIJ-VAN WISSEN, C. P. W. G. M.; AARNOUTSE, R. E.; BURGER, D. M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 816, n. 1–2, p. 121–129, 2005.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 624–630, 2005.

**5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO
CROMATOGRÁFICO EMPREGADO NA QUANTIFICAÇÃO
DAS AMOSTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO OBTIDAS POR
MEIO DO MODELO DE PERFUSÃO *IN SITU***

RESUMO

Muitos fármacos disponíveis comercialmente são destinados à administração oral. Assim, as características de solubilidade e de permeabilidade estão relacionadas à biodisponibilidade oral, dentre outros fatores. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta para classificar os fármacos em quatro classes distintas. Entretanto, outro fator de grande importância é o metabolismo intestinal, o qual ocorre na parede do trato gastrointestinal (TGI). Com base nisso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto como uma ferramenta adicional ao SCB e também classifica os fármacos em quatro classes de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Devido às barreiras físicas e bioquímicas que afetam os processos de absorção, a quantidade de fármaco que é capaz de atravessar o TGI e alcançar a corrente circulatória poderá, enfim, se distribuir pelo organismo até seu sítio de ação farmacológica, de acordo com as propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Uma vez que a permeabilidade depende de diferentes fatores, sua determinação experimental consiste na aplicação de diferentes modelos, dentre os quais se destaca o modelo de perfusão *in situ*. A possibilidade de coleta de sangue mesentérico neste modelo permite compreender o quanto do fármaco realmente passou para a corrente sanguínea, o que possibilita compreender com maior clareza os mecanismos envolvidos em sua absorção. Esta, por sua vez, influencia a biodisponibilidade oral e variações nesta propriedade acabam refletindo em problemas de eficácia terapêutica, tal como ocorre com fármacos antirretrovirais. O desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos constituem importantes etapas para a adequada aquisição dos resultados de permeabilidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método simples, rápido e econômico de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE) para permitir a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) presentes em amostras de plasma provenientes de ratos submetidos aos estudos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade e estabilidade. Como fase estacionária, uma coluna Phenomenex® C18 (150mm x 4,6mm x 5µm) foi empregada no método cromatográfico e a fase móvel consistiu de uma mistura de tampão fosfato (20 mM), metanol e acetonitrila na razão 92,5:7:0,5 (v/v/v, %). O pH foi ajustado para 4,5 com ácido ortofosfórico e o comprimento de onda para detecção em UV foi programado para 270 nm. As corridas cromatográficas foram realizadas sob fluxo constante de 1,2 mL/min e volume de injeção foi de 50 µL. Os valores de LD e LQ para as substâncias avaliadas mostraram-se adequados e abaixo da primeira concentração das curvas analíticas, as quais foram preparadas na faixa de 1 a 40 µg/mL. Além disso, a exatidão e a precisão do método, bem como estes parâmetros relacionados à avaliação da estabilidade, mostraram poucas variações (menor que 15%), o que indica a adequada execução dos experimentos em animais e o adequado preparo das amostras. Assim, o método FR-CLAE mostrou-se apropriado para ser empregado nos estudos de permeabilidade de fármacos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

Palavras-chave: antirretrovirais; CLAE; efluxo; metabolismo; perfusão *in situ*; permeabilidade.

INTRODUÇÃO

A via oral constitui a principal rota de administração de medicamentos devido sua conveniência, baixo custo e sua facilidade de adesão ao tratamento farmacoterapêutico por parte dos pacientes. Desta forma, fármacos que são administrados oralmente necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e de permeabilidade para que sua absorção e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade sejam adequadas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

Os processos de absorção ocorrem ao longo do trato gastrointestinal (TGI) e os enterócitos correspondem às células responsáveis pela absorção de nutrientes e substâncias diversas, inclusive fármacos. Estes, por sua vez, atravessam a parede do TGI utilizando um ou mais mecanismos de transporte. A presença de carreadores de efluxo no lado apical dos enterócitos causa limitações nos processos absorptivos, sendo a glicoproteína-P o transportador mais estudado atualmente. Além deste mecanismo, a ocorrência de metabolismo intestinal na parede do TGI também está relacionada às variações nos valores de biodisponibilidade de fármacos, tal como ocorre com os antirretrovirais (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI et al., 2016; GIACOMINI et al., 2010; SJÖGREN et al., 2014).

Os fármacos antirretrovirais são amplamente empregados no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids). Substâncias como estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) apresentam valores de biodisponibilidade *in vivo* variáveis, o que pode estar relacionado aos mecanismos limitantes da absorção como efluxo e metabolismo. Assim, estudos de permeabilidade podem auxiliar na compreensão dos fatores que interferem no transporte de fármacos através do TGI (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2013; STRAUCH et al., 2011).

Dentre os diferentes métodos que podem ser empregados na avaliação da permeabilidade intestinal, o modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico apresenta-se como o método mais próximo das condições *in vivo*. Além da integridade do suprimento sanguíneo e inervação, transportadores e enzimas permanecem ativas durante todo o período do ensaio. Desta forma, este modelo tem sido considerado altamente biorrelevante devido à boa correlação existente com os estudos realizados *in vivo* (BROUWERS et al., 2010; CAO et al., 2006; CAO; YU; SUN, 2008; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016, 2017;

FAGERHOLM; JOHANSSON; LENNERNÄS, 1996; LENNERNÄS, 2007; REIS et al., 2013; STAPPAERTS et al., 2015).

A adequada determinação das características de permeabilidade de substâncias está condicionada não somente às condições experimentais relacionadas ao modelo empregado, mas também à adequada quantificação das amostras provenientes de tais ensaios.

O método de quantificação deverá considerar as possíveis interferências que podem comprometer a aquisição de dados. Em ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico, a faixa de concentração do fármaco no plasma pode ser ampla, ou seja, o plasma pode apresentar baixa concentração do fármaco nos primeiros pontos de coleta das amostras e concentrações mais elevadas nos últimos pontos de coleta. Isso ocorre por fatores como capacidade de permeação do fármaco, fluxo sanguíneo mesentérico e tempo prolongado de execução dos ensaios (DEZANI et al., 2016, 2017).

Apesar de ser possível encontrar diferentes métodos analíticos e bioanalíticos descritos na literatura, ainda existe a necessidade de desenvolvimento de métodos cromatográficos capazes de quantificar faixas de concentração amplas com precisão e exatidão. Além disso, amostras de plasma contêm variadas impurezas que dificultam a quantificação de fármacos neste tipo de matriz.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método simples, rápido e econômico de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE) com detecção em UV que possibilite a quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT presentes em amostras de plasma sanguíneo obtidas a partir de ensaios de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT, bem como seus correspondentes padrões de referência, foram gentilmente doados pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil) e pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). Os solventes cromatográficos metanol e acetonitrila, o fosfato de potássio monobásico e o ácido ortofosfórico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapurificada foi obtida a partir do sistema de ultrapurificação Milli-Q® (Millipore, MA, EUA).

A solução de perfusão empregada nos estudos de perfusão *in situ* consistiu de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), manitol, polietilenoglicol-4000 (PEG-4000) e D-glicose (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007).

O sistema cromatográfico Shimadzu® (*Scientific Instrumentation*, Japan) constituído de bomba LC-10ADvp e detector de arranjo de diodos (*Diode Array*) SPD-M10Advp foi utilizado para a validação e para as análises de todas as amostras de plasma obtidas a partir dos experimentos de permeabilidade em modelo de perfusão *in situ*.

Métodos

Estudo de permeabilidade intestinal por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico

Os procedimentos realizados em animais obtiveram aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) sob número de protocolo de registro P404.

Os estudos de permeabilidade intestinal dos fármacos antirretrovirais foram conduzidos em modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico em ratos machos Wistar (250-300g). A solução de perfusão foi preparada de acordo com a seguinte composição: NaCl (48 mM), KCl (5,4 mM), Na_2HPO_4 (28 mM), NaH_2PO_4 (43 mM), manitol (35 mM), PEG-4000 (1 g/L) e D-glicose (10 mM). Todos

os componentes foram completamente solubilizados em água ultrapurificada (Milli-Q®) e o pH foi ajustado para 6,5 (DEZANI et al., 2016, 2017; JAIN et al., 2007; REIS et al., 2013).

Os fármacos d4T, 3TC e AZT foram adicionados individualmente à solução de perfusão e a concentração de cada substância foi baseada na dose máxima prescrita dividida pelo volume de 250 mL (CDER/FDA, 2000; DAHAN; WEST; AMIDON, 2009; DEZANI et al., 2016; KIM et al., 2006). Assim, a concentração final de cada substância na solução de perfusão foi de: 1,20 mg/mL para 3TC; 0,16 mg/mL para d4T e 1,20 mg/mL para AZT (AIDSINFO, 2017; DEZANI et al., 2016).

Todos os ensaios realizados em animais seguiram os protocolos experimentais descritos por Cummins e colaboradores (2003) e Brouwers e colaboradores (2010). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de mistura de cetamina-xilazina (0,1 g/kg e 0,02 g/kg, respectivamente) e acondicionados sobre uma superfície aquecida a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ para melhor controle dos procedimentos cirúrgicos e da anestesia. Uma porção de 10 cm do jejuno foi canulada em ambas as extremidades e a solução de perfusão sem o fármaco (branco) foi perfundida a 0,5 mL/min com a finalidade de remover quaisquer resíduos alimentares que possam estar presentes no lúmen intestinal. Para permitir a coleta de sangue durante os experimentos, a veia mesentérica foi canulada, assim como a veia jugular, a qual foi utilizada como via de reposição de sangue para o animal submetido ao ensaio de perfusão *in situ* (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016, 2017).

Após o período de limpeza intestinal, a solução de perfusão contendo o fármaco solubilizado foi perfundida no interior do intestino a um fluxo de 0,2 mL/min por 120 minutos. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da veia mesentérica. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 3500 rotações por minuto (rpm) e o plasma foi congelado a uma temperatura de -20°C até a realização das análises por CLAE (BROUWERS et al., 2010; CUMMINS et al., 2003; DEZANI et al., 2016, 2017).

É importante ressaltar que os procedimentos descritos para os estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* foram também realizados considerando os estudos de transporte de efluxo e metabolismo intestinal. Para isso, foram adicionados à solução de perfusão o inibidor de glicoproteína-P

(verapamil) e o inibidor de enzimas CYP3A (cetoconazol) nas concentrações de 200 e 50 µM, respectivamente.

As análises das amostras de plasma permitiram obter os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap}), a qual pode ser calculada de acordo com a Equação 5.4 (BROUWERS et al., 2010; DEZANI et al., 2016, 2017):

$$P_{ap} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_{doadora}}$$

Equação 5.4

onde: Q é a quantidade cumulativa do fármaco que aparece no sangue mesentérico em função do tempo t na condição de equilíbrio; A corresponde à área ($2\pi Rl$) de superfície intestinal disponível para a absorção considerando o comprimento (l) e o raio (R); e $C_{doadora}$ é a concentração do fármaco presente na solução de perfusão.

Preparo das amostras de plasma provenientes dos estudos de perfusão *in situ*

As amostras de plasma contendo os fármacos antirretrovirais foram preparadas utilizando o metoprolol como padrão interno (PI). Cada uma das amostras foi preparada da seguinte maneira: 500 µL de amostra foi adicionada em um tubo de ensaio contendo 100 µL de PI metoprolol (200 µg/mL) e a mistura foi homogeneizada por 30 segundos em agitador tipo vórtex. Em seguida, foram adicionados 2 mL de acetonitrila e a mistura foi homogeneizada novamente por 1 minuto. A suspensão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 3500 rpm e, posteriormente, foi filtrada em seringa de vidro com filtro de porosidade 0,45µm e seca sob atmosfera inerte de nitrogênio a 40°C. O resíduo foi ressuscendido com 150 µL de fase móvel para análise em CLAE.

Validação do método cromatográfico em CLAE

A validação do método cromatográfico em CLAE foi realizada de acordo com as preconizações descritas pelo ICH e pela ANVISA (ICH, 2005; BRASIL, 2003; BRASIL, 2012). Neste estudo, o plasma branco proveniente de ratos Wistar foi

considerado a matriz biológica para avaliar a existência de picos extras nos tempos de retenção dos fármacos nos cromatogramas.

As condições cromatográficas empregadas no presente estudo foram baseadas nos trabalhos publicados por Kano e colaboradores (2005) e Huang e colaboradores (2004), onde tais autores apresentam métodos bioanalíticos para a quantificação de 3TC e d4T em plasma humano (HUANG et al., 2004; KANO et al., 2005). Assim, o método desenvolvido e validado no presente trabalho considerou a quantificação dos três fármacos antirretrovirais (3TC, d4T e AZT) contidos em amostras de plasma sanguíneo de ratos provenientes dos estudos de permeabilidade (HUANG et al., 2004; KANO et al., 2005). O Quadro 5.1 apresenta as condições cromatográficas empregadas no desenvolvimento e validação do método analítico em CLAE.

Quadro 5.1: Condições cromatográficas definidas para a quantificação dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT em CLAE.

Condições cromatográficas	d4T	3TC	AZT
Detector	UV		
Comprimento de onda	270 nm		
Componentes da fase móvel, proporções e pH	Tampão fosfato 20 mM, metanol, acetonitrila (92,5:7:0,5 %), pH 4,5		
Tempos de retenção	9,8 minutos para d4T, 5,8 minutos para 3TC e 13 minutos para AZT		
Fase estacionária	Coluna cromatográfica Phenomenex® Gemini C18 de 15 cm		
Temperatura do forno	40°C		
Fluxo	1,2 mL/min		
Volume de injeção (µL)	50		
Padrão interno, comprimento de onda e tempo de retenção	Metoprolol 200 µg/mL, 270 nm, 15,6 minutos		

As soluções padrão estoque (SPE) dos fármacos foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL a partir dos padrões secundários com grau de pureza superior a 99%. Todas as soluções prontas foram levadas ao banho ultrassônico para degaseificação por 30 minutos.

Cada SPE foi diluída sucessivamente para permitir a obtenção das soluções padrão de trabalho (SPT) a serem empregadas na construção das curvas analíticas. Para os três antirretrovirais, as concentrações das SPT foram: 1; 2,5; 5; 10; 20; 30 e 40 µg/mL. Este procedimento foi realizado utilizando plasma sanguíneo como matriz a fim de possibilitar a adequada validação e posterior quantificação

das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade em modelo de perfusão *in situ*.

Os parâmetros de validação considerados para este trabalho incluíram: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, seletividade e estabilidade.

A seletividade do método foi verificada a partir da observação dos cromatogramas isolados de cada substância e da matriz. Este parâmetro teve como finalidade identificar a interferência de outros componentes não esperados nos cromatogramas (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

A linearidade foi avaliada por meio da comparação entre a área do pico obtida no cromatograma e a concentração do fármaco na SPT. A faixa de concentração utilizada na validação dos métodos cromatográficos para a quantificação dos fármacos antirretrovirais compreendeu o intervalo de 1,0 a 40 µg/mL (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

LD corresponde à menor concentração de fármaco que pode ser detectada pelo instrumento, não necessariamente determinável com precisão e exatidão, e seu valor é equivalente a três vezes o ruído da linha de base. Já o LQ corresponde à concentração mais baixa do fármaco que pode ser determinada com precisão e exatidão e seu valor é equivalente à relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA/BRASIL, 2003; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005; RUSSO; BARBATO; GRUMETTO, 2016).

A exatidão é definida como a concordância entre o valor observado no método proposto e o valor nominal. Tanto a exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia em réplicas de seis) quanto a interdia (análises realizadas em três dias diferentes em réplicas de nove, no total) considera três níveis de concentração: alta, média, baixa (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016).

Os três níveis de concentração definidos para os fármacos antirretrovirais foram: 2,5 µg/mL (baixa), 20 µg/mL (média) e 30 µg/mL (alta). Os valores das áreas dos picos correspondentes a cada fármaco foram comparados com a correspondente concentração nominal.

A exatidão foi calculada de acordo com a Equação 5.5:

$$Exatidão (\%) = \frac{C_d}{C_t} \times 100$$

Equação 5.5

onde: C_d é a concentração do fármaco determinada experimentalmente e C_t é a concentração teórica do fármaco.

A precisão do método foi verificada pela determinação dos três níveis de concentração no mesmo dia (repetibilidade) e em dias consecutivos (precisão intermediária). Este parâmetro foi calculado com base na Equação 5.6 (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012):

$$DPR (\%) = \frac{DP}{C_m} \times 100$$

Equação 5.6

onde: DPR corresponde ao desvio padrão relativo; DP é o desvio padrão e C_m é a concentração média.

A precisão intermediária foi realizada por meio da análise das amostras com analistas diferentes, em dias diferentes.

A avaliação da estabilidade teve como objetivo garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade. Para este parâmetro, foram consideradas amostras recém-preparadas, amostras preparadas e expostas à 37°C por 4 horas, amostras preparadas e expostas 24 horas à temperatura ambiente e amostras preparadas e submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento (ciclo CD).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Validação do método cromatográfico FR-CLAE

O método cromatográfico validado (FR-CLAE) apresentou-se linear na faixa de valores de concentração considerada para a quantificação de cada fármaco. Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos a partir das curvas analíticas foram superiores a 0,999 para todas as substâncias. Os valores de LD e LQ para as substâncias avaliadas mostraram-se adequados e abaixo da primeira concentração das curvas analíticas. A Tabela 5.3 apresenta os valores de r^2 e os valores referentes ao LD e LQ.

Tabela 5.3: Resultados referentes aos parâmetros LD, LQ e coeficientes de determinação (r^2) obtidos em plasma na validação do método cromatográfico para a quantificação dos fármacos antirretrovirais. Os valores expressam a média de seis determinações.

Fármaco	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Coeficiente de correlação (r^2)
3TC	0,30	0,99	0,9999
AZT	0,28	0,98	0,9999
d4T	0,32	1,00	0,9999

De acordo com a Tabela 5.3, os valores de LD e LQ estiveram abaixo da primeira concentração das curvas analíticas, o que indica a capacidade deste método cromatográfico em identificar pequenas diferenças de concentração nas amostras de plasma.

O método cromatográfico demonstrou boa linearidade na faixa de concentração considerada no presente estudo (1 a 40 µg/mL), o que permitiu sua aplicação na quantificação das amostras de plasma com diferentes concentrações.

A especificidade foi verificada com base na comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da matriz sem fármaco (branco) e a partir das soluções contendo os fármacos solubilizados. As substâncias do estudo apresentaram boa separação da matriz com tempos de retenção de 5,8 minutos para a 3TC, 9,8 minutos para a d4T e 13,0 minutos para a AZT.

Além disso, os cromatogramas referentes à fase móvel e à eluição da matriz isenta de fármaco foram verificados com o propósito de verificar a presença de interferentes (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). A Figura 5.2 apresenta os cromatogramas obtidos para a verificação da especificidade.

Figura 5.2: Cromatogramas obtidos por CLAE correspondentes ao plasma branco (A), plasma com os fármacos antirretrovirais (20 µg/mL) e o padrão interno (B), plasma com verapamil (C) e plasma com cetoconazol (D). A detecção foi obtida em UV com comprimento de onda de 270nm.

De acordo com a Figura 5.2, nenhum pico adicional foi observado e o método cromatográfico desenvolvido apresentou boa separação dos fármacos e do padrão interno. O processo de precipitação de proteínas pela adição de acetonitrila foi eficiente na aquisição dos cromatogramas, uma vez que estes não apresentaram interferências relevantes durante o tempo de corrida.

Embora o tempo de corrida tenha sido de 18 minutos (Figura 5.2), a grande vantagem do método cromatográfico desenvolvido foi a capacidade de realizar a quantificação simultânea dos três fármacos antirretrovirais, o que significa uma considerável vantagem sobre outros métodos descritos na literatura.

O parâmetro de precisão foi determinado com base na análise de três níveis de concentração (2,5, 20 e 30 µg/mL) em réplicas de seis para cada concentração no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias diferentes (precisão interensaio). As análises de exatidão intradia (análises realizadas no mesmo dia) e interdia (análises realizadas em três dias diferentes, preferencialmente com analistas diferentes) foram realizadas utilizando três níveis de concentração (2,5, 20 e 30 µg/mL) (ANVISA/BRASIL, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016). A Tabela 5.4 apresenta os valores de precisão e de exatidão para cada uma das substâncias utilizadas no presente trabalho.

Tabela 5.4: Resultados referentes à precisão e à exatidão (intraensaio e interensaio) do método cromatográfico em CLAE para a quantificação de d4T, 3TC e AZT.

Concentração (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intraensaio	Interensaio	Intraensaio	Interensaio
3TC				
2,5	96,79	101,35	100,47	99,56
20	98,10	98,39	98,27	100,95
30	100,91	102,10	96,24	101,25
AZT				
2,5	97,12	98,24	101,82	101,25
20	99,95	99,87	99,75	98,84
30	100,14	98,26	98,35	99,88
d4T				
2,5	101,02	98,54	97,52	101,43
20	99,55	99,32	99,12	99,55
30	98,22	99,94	96,19	98,24

Conforme apresentado na Tabela 5.4, os resultados de precisão e exatidão mostraram poucas variações em seus valores (menos que 15% de variação), o que indica que o método foi capaz de fornecer dados confiáveis para as análises de amostras de plasma obtidas a partir dos ensaios de perfusão *in situ*.

A avaliação da estabilidade considerou amostras recém-preparadas (RP), amostras preparadas e expostas à 37°C por 4 horas, amostras preparadas e expostas 24 horas à temperatura ambiente e amostras submetidas a ciclos de congelamento-descongelamento (ciclo CD). A Tabela 5.5 apresenta os valores referentes a esse parâmetro.

Tabela 5.5: Resultados referentes à exatidão do método cromatográfico obtidos a partir da avaliação da estabilidade das amostras de d4T, 3TC e AZT.

Condição	Exatidão (%)		
	2,5 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL
3TC (RP*)	101,12	103,20	99,07
4 h	102,21	99,98	98,42
24 h	98,54	99,99	99,44
ciclo CD**	95,78	96,85	98,63
AZT (RP*)	99,15	100,23	99,18
4 h	102,12	96,75	100,58
24 h	102,15	98,12	99,66
ciclo CD**	104,78	102,54	97,61
d4T (RP*)	99,54	98,14	99,54
4 h	103,78	102,18	101,77
24 h	102,54	98,22	98,98
ciclo CD**	103,89	103,76	98,26

* amostras recém-preparadas;

** ciclo congelamento-descongelamento.

Conforme apresentado na Tabela 5.5, os valores encontrados para exatidão mostraram que houveram poucas interferências na aquisição dos dados mediante as condições empregadas na avaliação da estabilidade. Esta avaliação indicou que

as amostras submetidas às condições analisadas estiveram de acordo com os limites estabelecidos (variação menor que 15%) (ANVISA/BRASIL, 2012).

Além disso, a Tabela 5.5 também mostra que as substâncias avaliadas contidas em amostras de plasma permaneceram estáveis por até 24 horas em temperatura ambiente. As amostras submetidas a um ciclo CD também não apresentaram grandes diferenças.

Aplicação do método FR-CLAE validado na quantificação das amostras de plasma

A validação do método cromatográfico foi adequada, uma vez que os parâmetros avaliados estiveram de acordo com as preconizações do ICH e da ANVISA. Assim, o método apresentou-se apto para ser empregado na quantificação dos fármacos antirretrovirais presentes nas amostras de plasma obtidas por meio do modelo de **perfusão *in situ***. **Desta forma, foi possível calcular os resultados de P_{ap} , os quais são mostrados na Tabela 5.6.**

Tabela 5.6: Resultados (n=6) de P_{ap} para 3TC, d4T e AZT e seus respectivos valores de desvio padrão (DP) obtidos para cada condição experimental realizada no modelo de perfusão *in situ* (permeabilidade, transporte de efluxo e metabolismo intestinal).

$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ cm/s}$			
Fármaco	Sem inibidor	Com verapamil	Com cetoconazol
3TC	0,23 $\pm$ 0,050	0,42 $\pm$ 0,067	0,26 $\pm$ 0,025
d4T	0,49 $\pm$ 0,074	0,51 $\pm$ 0,082	0,47 $\pm$ 0,073
AZT	0,50 $\pm$ 0,031	0,60 $\pm$ 0,040	0,55 $\pm$ 0,093

Conforme apresentado na Tabela 5.6, o método cromatográfico em FR-CLAE empregado para a quantificação dos fármacos antirretrovirais permitiu a quantificação adequada das amostras de plasma, uma vez que pequenos valores foram capazes de serem quantificados em função dos bons parâmetros de LD e

LQ, o que foi demonstrado também pelos baixos valores dos desvios padrão observados.

O procedimento de validação do método cromatográfico em CLAE mostrou que tal método pode ser adequadamente aplicável na quantificação de amostras que contenham fármacos antirretrovirais de uma maneira simples e econômica. Os resultados mostrados da Tabela 5.6 indicaram que tanto os experimentos realizados em animais quanto o preparo das amostras de plasma foram apropriados no presente estudo.

CONCLUSÃO

O método FR-CLAE desenvolvido e validado apresentou-se adequado para a quantificação dos fármacos antirretrovirais presentes nas amostras de plasma obtidas a partir dos ensaios de permeabilidade intestinal em modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue.

Os parâmetros avaliados estiveram de acordo com as preconizações estabelecidas pelo ICH e ANVISA. Desta forma, a linearidade foi adequada com coeficiente de correlação acima de 0,999 e os parâmetros LD e LQ permitiram que as quantificações dos fármacos fossem possíveis mesmo que houvessem variações de concentração nas amostras.

A seletividade também indicou que os experimentos em animais e o preparo das amostras pelo método de precipitação de proteínas foram adequados, uma vez que os cromatogramas apresentaram-se límpidos e isentos de picos adicionais que pudessem interferir nas análises.

Além disso, os parâmetros de exatidão e precisão mostraram poucas variações (menor que 15%), o que permitiu a aquisição dos resultados de P_{ap} com menores desvios e garantindo a confiabilidade dos dados adquiridos.

Assim, com base no exposto, o método cromatográfico foi adequadamente validado e os procedimentos descritos em relação às análises cromatográficas viabilizou a aplicação deste método na quantificação dos fármacos antirretrovirais em plasma com menores custos e com maior velocidade de aquisição de dados.

REFERÊNCIAS

AIDSINFO. FDA-Approved HIV Medicines. Disponível em: <<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

ANVISA/BRASIL. Resolução n 899 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da União, v. 29 de maio, 2003.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diário oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BROUWERS, J. et al. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, n. 5–6, p. 278–285, 2010.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CAO, X.; YU, L. X.; SUN, D. Drug absorption principles. In: **Biopharmaceutics Applications in Drug Development**. New York: Springer, 2008. p. 75–100.

CDER/FDA. Guidance for Industry waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research, n. August, 2000.

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 306–314, 2003.

DAHAN, A.; WEST, B. T.; AMIDON, G. L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSP-IP) approach in the rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2–3, p. 320–329, 2009.

DEZANI, T. M. et al. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 131–139, 2016.

DEZANI, T. M. et al. In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1336–1342, 1996.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

HUANG, Y. et al. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric assay for the simultaneous determination of didanosine and stavudine in human plasma, bronchoalveolar lavage fluid, alveolar cells, peripheral blood mononuclear cells, seminal plasma, cerebrospinal fluid an. **Journal of Chromatography B**, v. 799, n. 1, p. 51–61, 5 jan. 2004.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, v. 4, n. November 2005, 2005.

JAIN, R. et al. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 233–240, 2007.

KANO, E. K. et al. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, n. 1–2, p. 73–79, 2005.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686–694, 2006.

LENNERNÄS, H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

RUSSO, G.; BARBATO, F.; GRUMETTO, L. A validated LC/UV method for the determination of four adulterating drugs in herbal slimming capsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 436–445, 2016.

SILVA, A. L. L. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Stavudine **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2012.

SJÖGREN, E. et al. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies , model selection , correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation / API / excipient characterization including food. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 99–151, 2014.

SOARES, K. C. C. et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2409–2423, 2013.

STAPPAERTS, J. et al. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: Challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 665–681, 2015.

STRAUCH, S. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Lamivudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2054–2063, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. UNITED STATES PHARMACOPEIA39/National Formulary 34. Rockville USP, , 2016.

5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS EMPREGADO NA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DOS ESTUDOS *IN VITRO* MDCK E MDCK-MDR1

RESUMO

Fármacos que são administrados por via oral necessitam ser adequadamente solubilizados nos líquidos presentes no trato gastrointestinal (TGI) para que a permeabilidade ocorra posteriormente. Desta forma, as características de solubilidade e de permeabilidade estão relacionadas aos processos de absorção e, consequentemente, à biodisponibilidade. Desta forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta baseada na solubilidade e na permeabilidade e permite a classificação dos fármacos. Além disso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) foi proposto como uma ferramenta complementar ao SCB e classifica os fármacos de acordo com suas características de solubilidade e metabolismo. Além disso, o SCBDF representa um importante papel na predição da absorção *in vivo*, uma vez que a influência de transportadores presentes em diferentes tecidos biológicos é também prevista por este sistema. Na absorção oral, o mecanismo de efluxo pode estar relacionado a problemas de biodisponibilidade incompleta de alguns fármacos, inclusive antirretrovirais. Estudos de permeabilidade e transporte em modelo *in vitro* baseado em culturas celulares como MDCK e MDCK-MDR1 podem ser úteis na elucidação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade dos fármacos antirretrovirais. Além disso, o método analítico de quantificação consitui uma etapa fundamental na aquisição de resultados precisos e confiáveis. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a quantificação dos fármacos antirretrovirais estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) contidos em amostras provenientes dos estudos em culturas celulares MDCK e MDCK-MDR1 empregados para a avaliação da permeabilidade e do mecanismo de efluxo. As condições adotadas incluíram: coluna cromatográfica Sinergi polar-RP 80 Å (4,6mm x 75mm x 4µm), temperatura ambiente a 20°C, fonte de ionização por *electrospray* com voltagem de 5 kV e temperatura da fonte de 400°C. A fase móvel foi constituída por tampão acetato de amônio, água ultrapurificada e acetonitrila em proporções diferenciadas. Os tempos de retenção para cada substância foram: 2,7 minutos para a d4T; 2,9 minutos para a 3TC; 3,3 minutos para a zidovudina e 4,5 minutos para a carbamazepina (CBZ), a qual foi empregada como padrão interno. A faixa de concentração das soluções de trabalho foi de 0,5 a 1000 nM. O método analítico apresentou-se linear com coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 para todas as substâncias envolvidas no presente trabalho. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos apresentaram-se na faixa de 0,01 nM e 0,38 nM, o que é abaixo do primeiro ponto da curva analítica preparada. Os demais parâmetros apresentaram-se de acordo com o preconizado em literatura específica. Assim, o método cromatográfico LC-MS/MS validado demonstrou-se adequado para a quantificação dos fármacos antirretrovirais contidos em amostras provenientes de estudos *in vitro* em culturas celulares MDCK e MDCK-MDR1.

Palavras-chave: antirretrovirais; cromatografia; LC-MS/MS; MDCK; MDCK-MDR1; permeabilidade.

INTRODUÇÃO

Fármacos administrados oralmente necessitam apresentar adequadas características de solubilidade e permeabilidade para que a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade ocorram adequadamente (AMIDON et al., 1995).

Com base nestas duas características, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto como uma ferramenta que classifica os fármacos em diferentes classes. Além disso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Distribuição de Fármacos (SCBDF) também foi proposto como uma ferramenta complementar aos SCB e considera as características de solubilidade e metabolismo para a classificação de fármacos. O SCB também representa um importante papel na avaliação da interferência de carreadores presentes em diferentes tecidos biológicos, inclusive no trato gastrointestinal (TGI) (AMIDON et al., 1995; HOSEY; CHAN; BENET, 2016; WU; BENET, 2005).

Assim, os estudos de permeabilidade e transporte de fármacos para predição da absorção *in vivo* têm sido descritos na literatura desde o estabelecimento dos dois sistemas de classificação. A influência de transportadores de efluxo, tal como a glicoproteína-P (P-gp), tem sido bastante estudada nos últimos anos, uma vez que este carreador é capaz de limitar a absorção oral de substâncias (JUNIOR et al., 2015; SHUGARTS; BENET, 2009).

Fármacos antirretovirais como estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) apresentam valores de biodisponibilidade variáveis, o que pode estar relacionado ao mecanismo de efluxo causado pela P-gp. Desta forma, estudos de transporte que são capazes de avaliar uma substância como substrato da P-gp deverem ser realizados afim de possibilitar a correta predição de absorção *in vivo* em seres humanos (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001; JUNIOR et al., 2015; OTIS et al., 2001; WOHNSLAND; FALLER, 2001).

Diferentes métodos têm sido descritos na literatura em relação aos estudos de permeabilidade e transporte de fármacos. Modelos *in vitro* que empregam culturas celulares têm sido constantemente utilizadas para avaliar os mecanismos de transporte de diversas substâncias em conjunto com outros métodos. Assim, a linhagem MDCK constitui um modelo de células originárias de rim canino com alto poder de diferenciação, formando monocamadas celulares que permitem simular o intestino. Sua linhagem derivada MDCK-MDR1 é constituída de células MDCK que

foram transfectadas com o gene MDR1 para superexpressar a P-gp na superfície apical das células (DE SOUZA et al., 2009; JUNIOR et al., 2015).

A aquisição de bons resultados provenientes dos estudos de permeabilidade e de transporte de efluxo depende também do método instrumental que foi empregado para quantificar as amostras provenientes destes ensaios. Desta forma, a validação de métodos em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) permite assegurar a confiabilidade dos dados adquiridos. Assim, os estudos realizados em modelos MDCK e MDCK-MDR1 com fármacos antirretrovirais necessitam de método quantitativo que seja adequado, sensível e seletivo para a realização das análises das amostras.

Embora alguns trabalhos sejam encontrados na literatura em relação à validação de métodos de cromatografia, o LC-MS/MS representa maior sensibilidade, seletividade e especificidade, o que permite adquirir dados confiáveis com precisão e exatidão adequados em menos tempo, além de possibilitar a análise de amostras com volume limitado, tal como ocorre nos experimentos *in vitro* em culturas celulares (CHU et al., 2002; HAKALA et al., 2003; KOLJONEN et al., 2006; LIU et al., 2003; NOVÁKOVÁ; MATYSOVÁ; SOLICH, 2006; SWARTZ, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método LC-MS/MS para quantificação de fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) presentes em amostras provenientes dos ensaios de permeabilidade e transporte de efluxo realizados em modelos *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Os fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT e seus respectivos padrões de referência foram gentilmente doados pela Fundação para o Remédio Popular (FURP, São Paulo, Brasil) e pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil).

O reagente cromatográfico acetonitrila foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetato de amônio e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água ultrapurificada foi obtida partir do sistema de ultrapurificação Milli-Q® (Millipore, MA, EUA).

Os materiais empregados nos estudos de permeabilidade e transporte de efluxo em MDCK e MDCK-MDR1 (solução de Hanks, solução de HEPES e soro bovino fetal) foram adquiridos da Unidade de Cultura Celular da Universidade da Califórnia San Francisco (UCC/UCSF, CA, EUA).

As linhagens de células MDCK e MDCK-MDR1 foram fornecidas pelo Dr. Ira Paston do Instituto Nacional do Câncer pertencente ao Centro Nacional da Saúde (NCI/NIH, EUA).

O sistema cromatográfico LC-MS/MS *Prominence Shimadzu* (Kyoto, Japan) equipado com amostrador automático SIL-20AC, bomba de alta pressão LC-20AB, degaseificador DGU-20A3, interface CBM-20Alite e o programa gestor do sistema LC-solution foi empregado nos processos de desenvolvimento e validação do método descrito no presente trabalho.

Métodos

Estudos *in vitro* de permeabilidade e transporte de efluxo em MDCK e MDCK-MDR1

Os estudos de permeabilidade e transporte de efluxo foram realizados em modelos *in vitro* com o emprego de culturas celulares MDCK e MDCK-MDR1 para avaliação dos mecanismos envolvidos no transporte de fármacos antirretrovirais.

Os experimentos em MDCK e em MDCK-MDR1 foram realizados bidirecionalmente, ou seja, no sentido apical-basolateral (A→B) e no sentido

basolateral-apical (B→A). A substância GG918 foi empregada como inibidor de P-gp.

As culturas celulares foram cultivadas em placas com seis poços que foram preparados com a adição da suspensão celular a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ células/mL. Após o período de crescimento celular, foram realizados os estudos de transporte com os fármacos antirretrovirais na ausência e na presença de inibidor de P-gp (GG918) em triplicata (n=3). As amostras foram coletas nos tempos 30, 60 e 90 minutos com reposição de meio de transporte isento de fármaco.

O meio de transporte consistiu de mistura de solução de Hanks com 25mM de HEPES e 1% de soro bovino fetal (pH 7,4 a $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

As amostras coletadas a partir dos ensaios em MDCK e em MDCK-MDR1 permitiram obter os resultados de permeabilidade aparente (P_{ap}), a qual pode ser calculada de acordo com a Equação 5.7:

$$P_{ap} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0}$$

Equação 5.7

onde: $\Delta Q/\Delta t$ é o fluxo em $\mu\text{mol}/\text{min}$ ou a quantidade de fármaco permeado através do segmento intestinal no tempo t ; A é a área de exposição da monocamada celular ($4,2 \text{ cm}^2$); e C_0 corresponde à concentração inicial do fármaco na solução colocada em contato com a monocamada celular (compartimento doador).

Validação do método LC-MS/MS

A validação do método LC-MS/MS foi realizada com coluna cromatográfica Phenomenex® Sinergi polar-RP 80Å (4,6mm x 75mm, 4 μm). As análises cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente (20°C), fonte de ionização por *electrospray* com voltagem de 5 kV e temperatura da fonte de 400°C .

A fase móvel foi constituída por tampão acetato de amônio (10 mM), água ultrapurificada e acetonitrila em proporções diferenciadas. O Quadro 5.2 apresenta as condições cromatográficas empregadas na validação do método LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais presentes nas amostras provenientes de estudo em MDCK e MDCK-MDR1.

Quadro 5.2: Condições adotadas para os processos de validação cromatográfica por LC-MS/MS para a quantificação dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) contidos em amostras provenientes dos estudos *in vitro* em MDCK e MDCK-MDR1.

Parâmetros	d4T	AZT	3TC
Detector	MS/MS		
Massa Q1/Q2 (Da)	225,2/127,1	268,0/127,2	230,2/112,2
Composição da fase móvel	Água ultrapurificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (90:10, %)		
Volume de injeção	30 µL		
Fluxo da fase móvel	0,75 mL/min		

A solução preparada como fase móvel foi homogeneizada e filtrada em membrana filtrante de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm. Logo após, a solução foi degaseificada em banho ultrassônico por 30 minutos antes do seu uso no sistema cromatográfico.

A solução padrão estoque (SPE) foi preparada a 1 µM a partir da solubilização dos fármacos em água ultrapurificada: acetonitrila (50:50, %).

Cada SPE foi sucessivamente diluída para a obtenção dos diferentes níveis de concentração das soluções padrão de trabalho (SPT). Assim, as concentrações obtidas para os três fármacos antirretrovirais foram: 0,5; 1; 10; 50; 75; 125; 250; 500; 750 e 1000 nM. As diluições foram realizadas na matriz obtida dos experimentos em culturas celulares. Após o preparo, todas as soluções foram levadas ao banho ultrassônico para degaseificação por 30 minutos.

Para todos os procedimentos cromatográficos realizados, a carbamazepina (CBZ) foi empregada como padrão interno (PI) na concentração de 2 µM.

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção das curvas analíticas com as SPT preparadas para os fármacos antirretrovirais em diferentes níveis de concentração (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

A avaliação da especificidade do método consistiu na comparação feita entre os cromatogramas obtidos a partir da SPT de cada fármaco do estudo. Além disso, os cromatogramas correspondentes à eluição da fase móvel e à eluição da matriz isenta de fármaco foram também verificados (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

Os parâmetros de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados com base nos valores obtidos na construção de três curvas analíticas, considerando o desvio padrão da inclinação a (DPa) e a inclinação da reta (IC).

A precisão do método foi determinada a partir da avaliação dos três níveis de concentração da SPT (10, 250 e 750 nM) em réplicas de seis no mesmo dia (precisão intraensaio) e em dias diferentes (precisão interensaio) (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

A exatidão intradia e a exatidão interdias foram avaliadas com base nos três níveis de concentração da SPT (10, 250 e 750 nM) (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os procedimentos de validação em LC-MS/MS foram baseados nas preconizações descritas pela RE n° 899/2003 e RDC n° 27/2012 da ANVISA e pelo ICH (*International Conference on Harmonisation*) (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

O desenvolvimento do método LC-MS/MS visou a quantificação dos fármacos antirretrovirais contidos em amostras provenientes dos estudos de permeabilidade e transporte de efluxo em modelos *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1.

A seletividade foi verificada pela observação dos cromatogramas obtidos pelo método cromatográfico para analisar a presença de picos extras que possam interferir nas análises. A Figura 5.3 apresenta os cromatogramas obtidos pelo método LC-MS/MS e as transições de massa para 3TC (Q1/Q2: 230,2/112,2), d4T (Q1/Q2: 225,2/127,1), AZT (Q1/Q2: 268,0/127,2) e CBZ (Q1/Q2: 237,0/194,3) (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005).

Figura 5.3: Cromatogramas obtidos pelo método LC-MS/MS validado para a quantificação dos fármacos d4t, 3TC e AZT e para o padrão interno CBZ.

De acordo com a Figura 5.3, os cromatogramas obtidos para os três fármacos do estudo e para o padrão interno (CBZ) não apresentaram picos adicionais que pudessem interferir nas análises cromatográficas. Assim, o método mostrou a adequada separação dos sinais na matriz do estudo, com tempos de retenção de 2,7 minutos para d4T, 2,9 minutos para 3TC, 3,3 minutos para AZT e 4,5 minutos para CBZ.

A linearidade do método foi verificada com base na faixa de concentração das SPT de cada fármaco (0,5 a 1000 nM). Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos para cada fármaco foram baseados na regressão quadrática ou ponderada

($1/x^2$) e os valores obtidos foram superiores a 0,99. A Tabela 5.7 apresenta os resultados referentes aos LD, LQ e aos r^2 obtidos para o método LC-MS/MS validado.

A linearidade constitui um importante parâmetro para a construção das curvas analíticas no desenvolvimento de um método. Nos estudos de permeabilidade e transporte por meio do uso de métodos *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1, as amostras obtidas podem apresentar concentrações variadas dos fármacos. Em um ensaio conduzido por Rao e Shinde (2009), a faixa de concentração considerada é menor (4 a 50 ng/mL) em comparação com o presente estudo (0,5 a 1000 ng/mL) (NAGESWARA RAO; SHINDE, 2009). A ampla faixa de concentrações apresentada no presente trabalho permite que o método seja aplicado na quantificação de amostras com concentrações variadas em estudos de permeabilidade.

Tabela 5.7: Valores obtidos para os LD, LQ e para os coeficientes de correlação (r^2) para cada fármaco antirretroviral. Os valores expressam a média de seis réplicas.

Fármaco	LD (nM)	LQ (nM)	Coeficiente de correlação (r^2)
Lamivudina	0,04	0,13	0,9995
Zidovudina	0,11	0,38	0,9981
Estavudina	0,01	0,04	0,9981

De acordo com a Tabela 5.7, os valores de LD e LQ estiveram bem abaixo do valor da primeira concentração da SPT de cada fármaco. Isto indica a capacidade do método LC-MS/MS em determinar baixas concentrações, ou seja, o método apresenta alta sensibilidade. Assim, pequenas diferenças na concentração do fármaco na amostra podem ser determinadas pelo método desenvolvido no presente trabalho.

Fayet e colaboradores (2009) publicaram a validação de um método LC-MS/MS para a determinação de diferentes fármacos antirretrovirais (darunavir, etravirina, maraviroque, raltegravir e ritonavir) em plasma. Embora os parâmetros

avaliados tenham apresentados bons resultados, os valores de LD e LQ não foram tão baixos quanto os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 5.7) (FAYET et al., 2009).

Com relação aos resultados de precisão e exatidão do método LC-MS/MS, estes apresentaram-se dentro das preconizações do ICH e ANVISA (ANVISA/BRASIL, 2003, 2012; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). A Tabela 5.8 apresenta os resultados de precisão e exatidão referentes à validação do método LC-MS/MS determinados com três níveis de concentração das SPT para cada fármaco.

Tabela 5.8: Valores de precisão e exatidão obtidos para o método LC-MS/MS validado para a quantificação da d4T, 3TC e AZT contidos em amostras provenientes dos estudos *in vitro* em MDCK e MDCK-MDR1.

Concentração (nM)	Precisão (%) (DPR)	Exatidão (%)
3TC		
10	3,50	104,00
250	2,00	96,80
750	1,60	90,00
AZT		
10	7,60	101,00
250	4,92	99,60
750	0,85	102,27
d4T		
10	2,10	104,29
250	9,50	91,38
750	0,90	96,12

Conforme apresentado na Tabela 5.8, as variações referentes à precisão e à exatidão estiveram dentro do limite máximo de 15% estabelecido para métodos bioanalíticos. Estes parâmetros indicaram a adequabilidade do método LC-MS/MS validado para a quantificação dos fármacos antirretrovirais.

Alguns estudos relacionados às validações de métodos para a quantificação de amostras contendo fármacos antirretrovirais podem ser encontrados na literatura. Matrizes biológicas como plasma e urina necessitam de preparo adequado antes das análises para que não haja interefência nos cromatogramas, o que poderia comprometer a aquisição de dados. Outras matrizes apresentadas na literatura ainda incluem: fluido de lavado broncoalveolar; líquido seminal; fluido cérebro-espinhal; tecidos provenientes de tonsilas, dentre outros líquidos biológicos (FAYET et al., 2009; HUANG et al., 2004).

Diferentes matrizes podem causar alterações nos parâmetros de validação avaliados. Huang e colaboradores (2004) publicaram um trabalho de validação para a quantificação de fármacos em diferentes matrizes biológicas e foi observado alterações entre os valores de LD e LQ em relação ao tipo de matriz (HUANG et al., 2004). Desta forma, os baixos valores de LD e de LQ obtidos no presente estudo (Tabela 5.7) indicam que as amostras obtidas a partir dos ensaios *in vitro* em MDCK e MDCK-MDR1 são mais limpas que as matrizes biológicas investigadas por Huang e colaboradores (2004).

Aplicação do método LC-MS/MS validado na quantificação das amostras provenientes dos estudos *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1

Uma vez que o método LC-MS/MS apresentou adequados parâmetros de validação, foi possível aplicá-lo na quantificação das amostras contendo os fármacos antirretrovirais provenientes dos ensaios *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1, uma vez que o método apresentou elevada sensibilidade e especificidade.

A corrida cromatográfica foi de curta duração, o que permitiu a rápida aquisição de resultados e, conseqüentemente, economia de tempo e de recursos associados às análises. As amostras quantificadas permitiram obter os resultados de P_{ap} , os quais foram calculados a partir da Equação 5.7 apresentada anteriormente. A Tabela 5.9 apresenta os resultados de P_{ap} adquiridos para os ensaios *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1 para investigação da permeabilidade e do transporte de efluxo dos fármacos antirretrovirais d4T, 3TC e AZT.

Tabela 5.9: Resultados (n=3) de P_{ap} referentes aos estudos bidirecionais dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) conduzidos em MDCK e MDCK-MDR1 (na ausência e na presença de GG918).

$P_{ap} \pm DP \times 10^{-5} \text{ (cm/s)}$						
MDCK			MDCK-MDR1			
			Sem GG918		Com GG918	
Fármaco	A→B	B→A	A→B	B→A	A→B	B→A
d4T	0,06±0,004	0,08±0,007	0,05±0,006	0,08±0,004	0,05±0,016	0,04±0,014
3TC	0,03±0,003	0,08±0,013	0,01±0,001	0,02±0,002	0,01±0,005	0,01±0,005
AZT	0,16±0,015	0,16±0,008	0,07±0,004	0,18±0,047	0,08±0,008	0,05±0,010

De acordo com a Tabela 5.9, os resultados de P_{ap} referentes aos ensaios *in vitro* em MDCK e MDCK-MDR1 foram adquiridos adequadamente. Além disso, os valores obtidos apresentaram-se estáveis, uma vez que os desvios padrão adquiridos foram coerentes.

CONCLUSÕES

O método LC-MS/MS foi validado no presente estudo e os parâmetros avaliados estiveram de acordo com as preconizações estabelecidas pelo ICH e pela ANVISA.

O método validado apresentou-se adequado para a quantificação dos fármacos antirretrovirais (d4T, 3TC e AZT) contidos em amostras provenientes dos ensaios *in vitro* MDCK e MDCK-MDR1 realizados para os estudos de permeabilidade e transporte de efluxo.

O curto tempo de corrida obtido no presente trabalho permitiu a rápida aquisição dos resultados de permeabilidade. Além disso, o método representou significativa diminuição dos custos relacionados aos estudos de permeabilidade intestinal e às análises cromatográficas.

Desta forma, a quantificação dos fármacos nos estudos de transporte de efluxo pode ser realizada, uma vez que o método apresentou linearidade superior a 0,99 para uma ampla faixa de concentração das SPT para cada fármaco. Além disso, os parâmetros de LD e LQ apresentaram-se abaixo do primeiro ponto de concentração das curvas analíticas (0,5 nM). Assim, estudos que necessitam de métodos de quantificação mais sensíveis, tal como o descrito no presente trabalho, fornecem resultados mais precisos e confiáveis. Deste modo, o método LC-MS/MS descrito pode ser aplicado nas análises laboratoriais diárias para a quantificação dos três fármacos antirretrovirais estudados.

REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANVISA/BRASIL. Resolução n 899 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da União, v. 29 de maio, 2003.

ANVISA/BRASIL. Resolução RE n 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. Diário oficial da União, v. 22 de maio, 2012.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1PII of original article: S0169-409X(96)00415-2. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 22 (1996) 67–84.1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

CHU, I. et al. Generic fast gradient liquid chromatography/tandem mass spectrometry techniques for the assessment of the in vitro permeability across the blood-brain barrier in drug discovery. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 15, p. 1501–1505, 2002.

DE SOUZA, J. et al. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4413–4419, 2009.

FAYET, A. et al. A LC–tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 11, p. 1057–1069, 2009.

HAKALA, K. S. et al. Development of LC/MS/MS Methods for Cocktail Dosed Caco-2 Samples Using Atmospheric Pressure Photoionization and Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 21, p. 5969–5977, 2003.

HOSEY, C. M.; CHAN, R.; BENET, L. Z. BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 251–60, 2016.

HUANG, Y. et al. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric assay for the simultaneous determination of didanosine and stavudine in human plasma,

bronchoalveolar lavage fluid, alveolar cells, peripheral blood mononuclear cells, seminal plasma, cerebrospinal fluid an. **Journal of Chromatography B**, v. 799, n. 1, p. 51–61, 5 jan. 2004.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, v. 4, n. November 2005, 2005.

JUNIOR, J. B. S. et al. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 858–871, 2015.

KOLJONEN, M. et al. Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 379–387, 2006.

LIU, H. et al. In Vitro Permeability of Poorly Aqueous Soluble Compounds Using Different Solubilizers in the PAMPA Assay with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Detection. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p. 1820–1826, 2003.

NAGESWARA RAO, R.; SHINDE, D. D. Two-dimensional LC–MS/MS determination of antiretroviral drugs in rat serum and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 994–999, 2009.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 908–918, 2006.

OTIS, K. W. et al. Evaluation of the BBMEC model for screening the CNS permeability of drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, n. 1, p. 71–77, 2001.

SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2039–2054, 2009.

SWARTZ, M. E. UPLCTM: An Introduction and Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7, p. 1253–1263, 2005.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 923–930, 2001.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde a implantação dos sistemas SCB e SCBDF, diferentes estudos relacionados à caracterização da solubilidade, permeabilidade e metabolismo têm sido desenvolvidos nos últimos anos.

O SCB constitui uma ferramenta de grande utilidade, uma vez que este sistema considera a solubilidade e a permeabilidade de fármacos para prever a absorção *in vivo*. Após a publicação do guia da FDA para bioisecção, os estudos de solubilidade e permeabilidade, bem como os critérios designados para a classificação biofarmacêutica de fármacos, foram estabelecidos no referido documento. A elaboração de uma nova versão do guia visa adequar as condições experimentais empregadas e deve ser publicada em breve.

A caracterização de um fármaco de acordo com sua solubilidade é relativamente simples, uma vez que tais ensaios são bem descritos no guia da FDA e considera fatores fisiológicos de temperatura e pH das soluções empregadas. Por outro lado, a grande versatilidade de ensaios de permeabilidade que podem ser executados reflete a dificuldade em estabelecer a padronização dos experimentos. Fatores biológicos relacionados aos animais empregados e/ou às culturas celulares podem causar grande variabilidade na aquisição dos resultados, o que favorece a classificação enganosa de substâncias.

Os ensaios realizados de acordo com os objetivos do SCB são de fácil execução. Entretanto, a predição da absorção *in vivo* depende ainda de variados fatores não considerados pelo este sistema. Assim, o SCBDF apresenta-se como uma ferramenta muito mais complexa que o SCB e que, por este motivo, seu emprego pelas agências reguladoras é dificultada desde a sua implantação em 2005.

O SCBDF não considera somente as características de solubilidade e metabolismo, mas também possui um importante papel na avaliação do impacto de transportadores presentes em diferentes tecidos biológicos, inclusive no trato gastrointestinal. A influência de carreadores de efluxo nos enterócitos, bem como a ocorrência de metabolismo intestinal constituem as principais barreiras física e bioquímica que limitam a absorção de substâncias.

Uma vez que ambos os sistemas (SCB e SCBDF) permitem classificar os fármacos em quatro classes, muitas comparações têm sido feitas entre eles para discutir qual dos dois apresenta-se mais adequado para prever o comportamento do fármaco *in vivo*. Entretanto, é importante destacar que o SCB e o SCBDF não

podem, de fato, serem diretamente comparados, uma vez que os propósitos de cada sistema são diferentes. A junção das duas ferramentas pode fornecer valiosas informações acerca das características biofarmacêuticas dos fármacos oralmente administrados.

Desta forma os estudos de solubilidade, permeabilidade e metabolismo intestinal podem ser de grande valor nas etapas iniciais do desenvolvimento farmacêutico, o que permite contribuir para que estratégias sejam empregadas em novos fármacos e novas formulações com o objetivo de gerenciar adequadamente os recursos relacionados aos estudos biofarmacêuticos, contribuindo para o melhoramento da eficácia e segurança dos medicamentos. Além disso, tais estudos contribuem de maneira significativa na previsão do comportamento *in vivo* de fármacos, o que permite que medicamentos que contenham fármaco classe I sejam elegíveis à bioisenção, reduzindo custos e diminuindo a exposição de voluntários sadios aos estudos clínicos.

Nos estudos de permeabilidade por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico, a estavudina e a zidovudina apresentaram os maiores valores de permeabilidade, enquanto a lamivudina apresentou o menor valor. Com base em somente nestes resultados (seja P_{ef} ou P_{ap}), este modelo poderia induzir uma conclusão distorcida em relação ao mecanismo de transporte dos antirretrovirais, embora o método de perfusão *in situ* seja considerado altamente biorrelevante. Desta forma, os estudos em culturas celulares permitiram complementar os resultados obtidos em ratos e verificar a diferença significativa entre os valores de permeabilidade dos fármacos antirretrovirais e do metoprolol. Este marcador apresenta elevada permeabilidade devido ao seu principal mecanismo de transporte: via passiva transcelular. Assim, os resultados obtidos permitiram sugerir que a permeação da estavudina, lamivudina e zidovudina provavelmente ocorre por meio da atuação de carreadores de influxo, os quais não são adequadamente expressos em MDCK.

Uma vez que todos os mecanismos estão funcionais no modelo de perfusão *in situ*, não é possível analisar separadamente cada via de transporte durante os estudos de permeabilidade. Desta forma, a combinação de diferentes modelos, tal como explicitado no presente estudo, é de suma importância para auxiliar na identificação do mecanismo predominantemente envolvido.

Embora os estudos de permeabilidade em modelo de perfusão *in situ* e em modelo *in vitro* MDCK tenham sugerido o possível envolvimento de transportadores de influxo nos processos de absorção dos fármacos antirretrovirais, a necessidade de investigar se o carreador de efluxo representava alguma influência na absorção limitada das substâncias foi confirmada, o que levou à execução dos experimentos sobre a P-gp.

Desta forma, os estudos de efluxo realizados por meio do modelo de perfusão *in situ* e em modelo *in vitro* MDCK-MDR1 indicaram que os três fármacos antirretrovirais apresentaram alguma interação com a P-gp. No entanto, a lamivudina e a zidovudina apresentaram diferenças significativas quando os valores de permeabilidade obtidos na ausência e na presença de inibidor de P-gp foram comparados.

Para a zidovudina, a P_{ap} indicou a não interação deste fármaco com o inibidor de efluxo, o que foi confirmado com os ensaios em MDCK-MDR1. Assim, a coerência entre o resultado em MDCK-MDR1 e P_{ap} destacou, mais uma vez, a maior precisão dos resultados de P_{ap} , o que enfatiza a grande importância da execução dos experimentos de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico.

Conforme exposto anteriormente, a avaliação da permeabilidade de fármacos por meio do modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico permite obter resultados de P_{ef} e de P_{ap} , uma vez que ambos os parâmetros são baseados na quantificação das substâncias estudadas presentes no perfusato e no sangue mesentérico, respectivamente. No entanto, a P_{ap} apresenta-se como um parâmetro que mais se assemelha à condição *in vivo*, uma vez que considera quantidade de fármaco que realmente foi capaz de superar as barreiras físicas e bioquímicas do trato gastrointestinal. Desta forma, fármacos que apresentam mecanismos de transporte que não a difusão passiva transcelular tendem a apresentar diferenças nos valores de P_{ef} e de P_{ap} . Em outras palavras, os resultados de P_{ef} nem sempre permitirão obter as mesmas conclusões observadas a partir dos resultados de P_{ap} . Nos estudos de efluxo da zidovudina, diferenças entre a P_{ef} e a P_{ap} puderam ser constatadas, o que sugeriu que o transporte deste fármaco através da parede do TGI pode envolver a ação de carreadores de influxo, o que ficou evidente nos estudos realizados em MDCK-MDR1, uma vez que os valores de permeabilidade de todos os fármacos antirretrovirais mostraram-se distantes dos valores obtidos para o marcador de alta permeabilidade (metoprolol).

Por outro lado, o elevado valor de F_a deste fármaco indica ainda a irrelevância clínica da interação entre a zidovudina e a P-gp. Em termos gerais, a alta permeabilidade e elevada F_a de um fármaco não indicam a necessidade de estudos para avaliar o envolvimento de carreadores e/ou metabolismo. Entretanto, a zidovudina é normalmente empregada em farmacoterapias de longa duração em pacientes com diferentes faixas etárias. Desta forma, o uso concomitante com outros fármacos é comum. Assim, a investigação do mecanismo de efluxo ou do metabolismo nos processos de absorção do referido fármaco permite avaliar o possível aumento da concentração plasmática da zidovudina em função da provável competição pelo mesmo carreador/enzima quando outro substrato está envolvido. Estudos complementares que verifiquem a intensidade de interação entre o fármaco e o transportador/enzima podem auxiliar no aprimoramento de formas farmacêuticas para elevar a biodisponibilidade.

Os estudos de metabolismo, por sua vez indicaram que nenhum dos fármacos apresentou interação significativa com as enzimas CYP3A no modelo de perfusão *in situ* com coleta de sangue mesentérico. Como o trato gastrointestinal constitui o maior sítio extra-hepático de metabolização de fármacos, é de suma importância destacar que outras enzimas não oxidativas (metabolismo de fase II, conjugação) podem estar relacionadas ao metabolismo intestinal e, portanto, à limitação da absorção dos fármacos antirretrovirais, especialmente a lamivudina, a qual apresenta a biodisponibilidade mais variável em comparação com os demais fármacos estudados.

A obtenção dos resultados de permeabilidade a partir de amostras de perfusato, de plasma ou de culturas celulares só foi possível devido à adequada etapa de desenvolvimento e validação dos métodos cromatográficos empregados na quantificação dos fármacos antirretrovirais contidos nas diferentes amostras obtidas no presente trabalho. Assim, um método preciso e exato permite a obtenção de resultados confiáveis e precisos.

Embora procedimentos de validação sejam descritos na literatura, vários fatores envolvidos no processamento das amostras podem causar variações nos métodos descritos, tais como: tipos de matrizes, tipos de substâncias estudadas e suas respectivas faixas de concentração.

Os métodos cromatográficos empregados na quantificação dos fármacos em amostras de perfusato e de plasma apresentaram-se adequados, assim como o

método LC-MS/MS. Todos os critérios considerados para verificar a aplicabilidade dos métodos foi baseada em resoluções brasileiras e internacionais.

Assim, os estudos realizados no presente trabalho permitiram destacar a importância da avaliação da permeabilidade, do mecanismo de efluxo e do metabolismo intestinal de fármacos oralmente administrados. No entanto, muitos estudos ainda necessitam ser realizados para considerar os demais parâmetros relacionados às propriedades ADME além da absorção.

Fármacos SCBDF classes II, III e IV apresentam maiores probabilidades de sofrer influência das interações fármaco-carreador e fármaco-enzima. Em geral, quando uma substância é substrato de P-gp, é muito provável que essa também seja substrato da CYP3A simultaneamente. Logo, tanto a P-gp quanto a CYP3A formam juntos uma importante barreira à absorção contra a entrada de substâncias prejudiciais e xenobióticos (*transporter-enzyme interplay*). Este mecanismo coordenado controla a entrada de diversas substâncias e seu grande impacto sobre a biodisponibilidade oral de fármacos deve ser significativamente considerada.

Embora muitos estudos têm sido desenvolvidos após o surgimento do SCB e do SCBDF para prever a absorção *in vivo*, muitas questões relacionadas às classificações biofarmacêuticas, aos estudos farmacocinéticos e às observações clínicas ainda permanecem sem resolução. O SCB e SCBDF juntos possibilitam prever o comportamento do fármaco *in vivo* em relação às propriedades ADME para responder tais questões. Desta forma, o presente estudo desenvolvido contribui para a caracterização adequada de fármacos em relação aos mecanismos de transporte envolvidos em seus processos de absorção, além de auxiliar na definição dos ensaios a serem executados e permitir, assim, a identificação de fatores críticos muitas vezes não considerados nas etapas de desenvolvimento farmacêutico.

ANEXO A

Informações para os membros da banca julgadora de tese de doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
  - 2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
  - 4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
  - 4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B

Aprovação do protocolo de estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 382013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "**Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ em ratos**" (Protocolo CEUA/FCF/404), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Thaís Marinho Pereira**, sob orientação/supervisão do(a) **Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 08 de abril de 2013.

São Paulo, 09 de abril de 2013.

Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO C

Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6962791/2 - Thaisa Marinho Dezani

Email: thaisamarinho@usp.br
Data de Nascimento: 25/12/1986
Cédula de Identidade: RG - 34.316.760-8 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2009
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Produção e Controle Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Doutorado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 07/02/2013
Início da Contagem de Prazo: 07/02/2013
Data Limite para o Depósito: 07/06/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 07/02/2013 até o presente. Email: chserra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/02/2013
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 07/02/2017 até 07/06/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/11/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/02/2013
 Prorrogação em 02/12/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2017

Impresso em: 04/06/2017 02:03:03

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 6962791/2 - Thaisa Marinho Dezani

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5794-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	06/03/2013	14/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5799-1/2	Farmacocinética Básica	07/03/2013	15/05/2013	150	10	90	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0432- Fundamentos de Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	05/08/2013	02/12/2013	-	3	-	-	-	-
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	100	A	N	Concluída
VCI5782-4/3	Técnicas Microscópicas e Imagiologia Aplicada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	21/10/2013	10/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/03/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2017

Impresso em: 04/06/2017 02:03:04

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função

205252	Cristina Helena dos Reis Serra	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2017

Impresso em: 04/06/2017 02:03:04

ANEXO D**Currículo Lattes**

Thaisa Marinho Dezani

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8930681649026019>

Última atualização do currículo em 16/05/2017

Resumo informado pelo autor

Doutorado sanduíche pela University of California San Francisco (UCSF, San Francisco, CA, USA) no Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences (2015-2016). Doutorado em Fármacos e Medicamentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP, São Paulo, SP, Brasil) (2013-atual). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela USP na área de Produção e Controle Farmacêuticos (2009-2012). Atua em pesquisa relacionada à área de biofarmacotécnica (biofarmácia) com ênfase nos estudos de solubilidade, permeabilidade e metabolismo de fármacos (sistema ADME). Bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Bolsista PDSE CAPES (2015-2016).

(Texto informado pelo autor)

Links para Outras Bases:

[SciELO - Artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome Thaisa Marinho Dezani

Filiação Charles Frederico de Almeida Pereira e Etienne Marinho de Almeida

Nascimento 25/12/1986 - São Paulo/SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2013 Doutorado em Fármaco e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
com **período sanduíche** em University of California San Francisco (Orientador : Leslie Z. Benet)
Título: Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ em ratos
Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2009 - 2012 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2008 Graduação em Farmácia.
Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

Título: Interações Medicamentosas com antidepressivos em pacientes internados
Orientador: Tânia Carmen Peñaranda Govato

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Perícia Criminal. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em UHPLC and UHPLC/MS in Pharmaceutical Applications. (Carga horária: 2h).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Técnicas de coleta de sangue. (Carga horária: 10h).
Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Técnicas de aplicação de injetáveis. (Carga horária: 10h).
Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Atenção Farmacêutica em Hipertensão Arterial. (Carga horária: 4h).
Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Aspectos Clínicos da Atenção Farmacêutica. (Carga horária: 4h).
Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: PAE , Enquadramento funcional: bolsista , Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2013 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Desenvolvimento do projeto "Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ em ratos". Bolsa CAPES.
- 2010 - 2010** Vínculo: PAE , Enquadramento funcional: Bolsista, Regime: Parcial
Outras informações:
Disciplina de Manipulação Farmacêutica (FBF-0342).
- 2009 - 2012** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, área de Produção e Controle Farmacêuticos. Bolsista CAPES.

Atividades

- 06/2013 - 05/2015** Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Especificação:
Membro eleito como representante discente titular junto à
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF/USP)

2. Hospital e Maternidade Cruz Azul de São Paulo - CRAZ

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estágio em farmácia hospitalar , Carga horária: 40, Regime: Integral
 Outras informações:
 Atividades: recebimento e dispensação de medicamentos e correlatos, controle de estoque e auxílio nas funções administrativas.

3. Universidade São Judas Tadeu - USJT

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área industrial , Carga horária: 20, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades: área de pesquisa e desenvolvimento de produtos domissanitários, produção e controle de qualidade.

2007 - 2007 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área de alimentos , Carga horária: 20, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Estágio na área de alimentos com o objetivo de pesquisa científica.

2006 - 2006 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área de Análises Clínicas , Carga horária: 20, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Coleta de materiais biológicos, preparação de amostras e realização de exames auxiliares de diagnóstico.

2006 - 2006 Vínculo: outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio na área de Farmácia , Carga horária: 20, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Estágio na área de farmácia com organização de medicamentos, análise de prescrições médicas.

4. University of California San Francisco - UCSF

Vínculo institucional

2015 - 2016 Vínculo: Exchange Visitor , Enquadramento funcional: Visiting Scholar , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

5. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Professora substituta , Enquadramento funcional: Professora, Regime: Parcial
Outras informações:
Professora substituta das disciplinas de Química Analítica, Química Geral e Físico-Química. Professora de Estágio Supervisionado (manipulação, farmacotécnica, produção e controle de qualidade).

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Avaliação dos mecanismos de absorção envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais com a utilização de método ex vivo (Franz cells) e método in vitro (PAMPA)
- Descrição: Estudo da permeabilidade de fármacos antirretrovirais com a utilização de método ex vivo (Franz cells) e método in vitro (PAMPA), considerando a ocorrência de mecanismos de efluxo e metabolismo no enterócito.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);
Integrantes: Thaisa Marinho Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); André Bersani Dezani
- 2013 - Atual** Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio do modelo de perfusão in situ em ratos
- Descrição: O trabalho tem como objetivo estudar a permeabilidade de fármacos antirretrovirais, bem como os mecanismos de efluxo que podem estar envolvidos e a ocorrência de metabolismo pré-hepático.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);
Integrantes: Thaisa Marinho Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); André Bersani Dezani
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP
- 2009 - 2012** Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica
- Descrição: O trabalho teve como objetivo avaliar a solubilidade empregando o método do equilíbrio (técnica shake-flask) e os ensaios de dissolução intrínseca. O estudo de permeabilidade intestinal foi realizado com o uso do modelo de perfusão in situ para os fármacos estavudina, lamivudina e zidovudina.
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: Thaisa Marinho Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); André Bersani Dezani; João Batista da Silva Júnior
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs
Número de produções C,T & A: 2/
- 2009 - 2010** Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica

Descrição: Neste trabalho objetivou-se avaliar a solubilidade e dissolução intrínseca da lamivudina e da zidovudina, bem como determinar a permeabilidade intestinal destes fármacos utilizando método ex vivo com uso de membranas intestinais provenientes de ratos.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0);

Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);

Integrantes: Thaisa Marinho Dezani; Cristina Helena dos Reis Serra (Responsável); André Bersani Dezani; Arthur Massabki Caffaro

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Revisor de periódico

1. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso)

Vínculo

2013 - Atual Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Biofarmacotécnica
2. Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica
3. Farmacologia Geral
4. Garantia e controle de qualidade farmacêuticos
5. Permeability

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Italiano Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **DEZANI, T.M.**; DEZANI, A.B.; SILVA, M.M.C.; SERRA, C.H.R.
In situ intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY. **JCR**, v.17, p.746 - 757, 2017.
2. **doi> DEZANI, THAISA MARINHO**; DEZANI, ANDRÉ BERSANI; JUNIOR, JOÃO BATISTA DA SILVA; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS
Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and Prediction of Fraction Absorbed and Permeability in Humans: A Study with Antiretroviral Drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. **JCR**, v.104, p.131 - 139, 2016.

3. **doi>** SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS; CHANG, KYUNG HEE; **DEZANI, THAISA MARINHO**; PORTA, VALENTINA; STORPIRTIS, SÍLVIA
Dissolution efficiency and bioequivalence study using urine data from healthy volunteers: a comparison between two tablet formulations of cephalexin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **JCR**, v.51, p.383 - 392, 2015.
4. **doi>** JÚNIOR, J.B.S.; **DEZANI, T.M.**; DEZANI, A. B.; Serra, C. H. R.
Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*. **JCR**, v.15, p.858 - 871, 2015.
5. **doi>** DEZANI, ANDRÉ BERSANI; **PEREIRA, THAISA MARINHO**; CAFFARO, ARTHUR MASSABKI; REIS, JULIANA MAZZA; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS
Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **JCR**, v.67, p.194 - 202, 2013.
6. **doi>** DEZANI, ANDRÉ BERSANI; **PEREIRA, THAISA MARINHO**; CAFFARO, ARTHUR MASSABKI; REIS, JULIANA MAZZA; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS
Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso)*. **JCR**, v.49, p.853 - 863, 2013.
7. **doi>** REIS, J.M.; DEZANI, A.B.; **PEREIRA, T.M.**; AVDEEF, A.; SERRA, C.H.R.
Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **JCR**, v.48, p.781 - 789, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Ferreira, J.C.F.; DEZANI, A.B.; **DEZANI, T. M.**; Silva, M.M.C.; SERRA, C.H.R.
Biopharmaceutical Classification System: solubility evaluation of didanosine (ddI) In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2014. v.50. p.20 - 20
2. Silva, M.M.C.; **DEZANI, T.M.**; DEZANI, A.B.; SERRA, C.H.R.
Development of a HPLC-UV method for quantification of zidovudine in buccal permeability studies In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2014. v.50. p.19 - 19
3. **DEZANI, T.M.**; DEZANI, A. B.; Silva, M.M.C.; SERRA, C.H.R.
Single-Pass Intestinal Perfusion as a method to predict absorption of drugs in humans: a study with cephalexin In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2014. v.50. p.20 - 20

Apresentação de trabalho e palestra

1. **DEZANI, T.M.**; Aguiar, M.M.G.B.
Apresentações das linhas de Pesquisa Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)

2. DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; SERRA, C.H.R.
Evaluation of solubility and permeability using Franz cells for Biopharmaceutical Classification System (BCS), 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. DEZANI, T.M.; DEZANI, A. B.
Experiências no exterior, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)
4. DEZANI, T.M.; DEZANI, A. B.; Silva, M.M.C.; Serra, C. H. R.
A rapid HPLC method for ranitidine quantification: Application for in situ intestinal perfusion studies, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
5. DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.
Métodos para avaliar a permeabilidade de fármacos, 2014. (Outra, Apresentação de Trabalho)
6. 🌟 PEREIRA, T. M.; DEZANI, A. B.; JÚNIOR, J.B.S.; Serra, C. H. R.
Intestinal permeability assay of antirretroviral drugs using in situ perfusion model, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
7. Serra, C. H. R.; PEREIRA, T. M.; DEZANI, A. B.; REIS, J. M.
Métodos para avaliar a permeabilidade de fármacos, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho)
8. 🌟 DEZANI, A. B.; PEREIRA, T. M.; CAFFARO, A. M.; Serra, C. H. R.
Permeability evaluation of lamivudine and zidovudine using ex vivo method, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
9. 🌟 PEREIRA, T. M.; DEZANI, A. B.; Serra, C. H. R.
Sistema de Classificação Biofarmacêutica: avaliação da solubilidade da estavudina utilizando o método shake flask, 2010. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
10. 🌟 PEREIRA, T. M.; MENDONÇA, P. C. A.; REGO, J. K.; GONÇALVES, P.L.C.; PINHEIRO, J. A. F.; GOVATO, T.C.P.
Interações Medicamentosas com antidepressivos em pacientes internados, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Artigos aceitos para publicação

1. DEZANI, ANDRÉ BERSANI; DEZANI, T. M.; Ferreira, J.C.F.; SERRA, C. H. R.
Solubility evaluation of didanosine: a comparison between equilibrium method and intrinsic dissolution for biopharmaceutical classification purposes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Impresso), 2017.

Participação em eventos

1. **4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress**, 2016. (Congresso)
Application of the Single-Pass Intestinal Perfusion studies on drug absorption prediction in humans.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress**, 2016. (Congresso)
Evaluation of intestinal permeability and efflux of lamivudine using ex vivo method in Franz cells.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress**, 2016. (Congresso)
Permeability study using the Single-Pass Intestinal Perfusion in rats: Is the zidovudine a substrate for P-gp?.

4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress**, 2016. (Congresso)
Solubility characterization of didanosine using shake flask and intrinsic dissolution methods: Application for biopharmaceutical classification.
5. **Animal Biosafety Level 3 (ABSL3) - UCSF**, 2015. (Outra)
6. **Biosafety Training - UCSF**, 2015. (Outra)
7. **Bloodborne Pathogens Training - UCSF**, 2015. (Outra)
8. **Carcinogen Training - UCSF**, 2015. (Outra)
9. **Cyber Security Awareness Training - UCSF**, 2015. (Outra)
10. **Laboratory Safety for Researchers - UCSF**, 2015. (Outra)
11. **Radiation Safety Training - UCSF**, 2015. (Outra)
12. **UCSF - AMGEN Symposium**, 2015. (Simpósio)
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2014. (Congresso)
Development of a HPLC-UV method for quantification of zidovudine in buccal permeability studies.
14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2014. (Congresso)
Biopharmaceutical Classification System: solubility evaluation of didanosine (ddI).
15. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **49ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2014. (Congresso)
Single-pass intestinal perfusion as a method to predict absorption of drugs in humans: a study with cephalexin.
16. **Workshop Polimorfos em Medicamentos - United States Pharmacopeia**, 2013. (Outra)
17. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **47ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2012. (Congresso)
Intestinal permeability assay of antiretroviral drugs using in situ perfusion model.
18. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **47ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2012. (Congresso)
Permeability evaluation of lamivudine and zidovudine using ex vivo method.
19. **Treinamento Operacional do Dissolutor Sotax CE7 Smart**, 2011. (Outra)
20. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **45ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2010. (Congresso)
Sistema de Classificação Biofarmacêutica: avaliação da solubilidade da estavudina utilizando o método shake flask.
21. **II Simpósio de Atualização em Farmacologia Clínica**, 2008. (Outra)
22. Apresentação Oral no(a) **XI EXPOFARMA XI JOFARMA**, 2008. (Outra)
Interações Medicamentosas com antidepressivos em pacientes internados.
23. **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos - VII Seminário Internacional de Farmacêuticos**, 2007. (Congresso)

ANEXO E

Artigos publicados

DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; SILVA, M.M.C.; SERRA, C.H.R. *In situ* intestinal perfusion in rodents: Future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 17, p.746-757, 2017.

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2017, 17, 746-757

REVIEW ARTICLE

***In Situ* Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs**

Thaís Marinho Dezani, André Bersani Dezani, Mônica Maria Coquemala da Silva and Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo - Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

Abstract: Background: In 1995, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed by Amidon and colleagues as a tool that considers two important parameters regarding drugs: solubility and permeability. Since then, several methods for solubility and permeability studies have been developed for drug delivery and absorption prediction. In recent years, permeability has gained a great highlight and the interaction between a molecule and a biological membrane is not enough to predict the *in vivo* behavior of a compound.

Method: Thus, different methods for permeability assessment are currently used for mechanistic studies including involvement of carriers and several transport pathways. Furthermore, the investigation regarding metabolism has been a focus in recent researches. Based on this idea, Wu and Benet proposed a new tool called Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS), where drugs are classified into four classes considering their solubility and metabolism.

Results: Among several methods for permeability studies, the *in situ* intestinal perfusion is considered the closest to *in vivo* conditions due advantages as intact blood supply and innervation.

Conclusion: This review presents the *in situ* intestinal perfusion model and its application for permeability/transport studies of drugs and intestinal metabolism. Also, this paper discusses about how the *in situ* perfusion studies can be used for classification of drugs and the future perspectives for *in vivo* absorption prediction.

ARTICLE HISTORY

Received: January 21, 2016

Revised: June 02, 2016

Accepted: June 19, 2016

DOI:

10.2174/1389557516666160921145613

Keywords: BCS, BDDCS, *in situ* perfusion, intestinal metabolism, permeability, transport.

1. INTRODUCTION

In 1995, Amidon and colleagues proposed the Biopharmaceutics Classification System (BCS) as a tool for drug assessment and it is based on aqueous solubility and permeability through biological membranes. Thus, drugs can be classified into four classes: (I) high solubility and high permeability, (II) low solubility and high permeability, (III) high solubility and low permeability, and (IV) low solubility and low permeability [1].

In 2000, Food and Drug Administration (FDA) adopted BCS for biowaiver purposes of class I drugs orally administered. Since then, the BCS is used for the development of new drugs and pharmaceutical dosage forms. Several methods were developed for solubility and permeability studies and some of them have been accepted by FDA for biopharmaceutical classification of drugs [2, 3].

Currently, for screening purposes, Caco-2 cell line has been widely used in pharmaceutical industries to select potential chemical entities. However, some drawbacks regarding this *in vitro* model can underestimate or overestimate the drug absorption due to irregular expression of carriers, lack of mucus layer and low intracellular levels of CYP3A enzymes. Also, the site-dependent absorption cannot be evaluated using cell cultures as well as enzyme-transporter interplay. The long period for cultivation (21 days) led some researchers to develop additional protocols with short period for cell growth. In this case, the establishment of a new protocol for cell culture in permeability/transport studies requires a good validation of the method and a good correlation between results from the new protocol and results from well-established models [4-6].

Among different methods used for permeability studies, the *in situ* intestinal perfusion has been used as a model due its similarity to the *in vivo* conditions such as intact blood supply, innervation, active carriers and enzymes. Although permeability studies have been strongly conducted since the FDA guidance publication, some methods may not explain doubts about absorption prediction. A well-established pro-

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo - Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; Tel: +55 11 30913623; Fax: +55 11 38154418; E-mail: chserra@usp.br

DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; JUNIOR, J.B.S.; SERRA, C.H.R. Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.104, p.131-139, 2016.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 104 (2016) 131–139

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) and prediction of fraction absorbed and permeability in humans: A study with antiretroviral drugs

Thaís Marinho Dezani, André Bersani Dezani, João Batista da Silva Junior, Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2015

Revised 17 March 2016

Accepted in revised form 24 April 2016

Available online 27 April 2016

Keywords:

Intestinal absorption

Permeability

Drug transport

Paracellular transport

Passive diffusion/transport

Fraction absorbed

ABSTRACT

In recent years, the prediction of oral drug absorption in humans has been a challenge for researchers and many techniques for permeability studies have been developed for several purposes, including bioavailability processes. The Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) method performed in rats can provide permeability results closest to *in vivo* condition. The purpose of the present study was to evaluate the intestinal permeability of the antiretroviral drugs lamivudine, stavudine and zidovudine using the SPIP method in rats and to predict their permeability ($P_{eff,humans}$) and fraction absorbed (F_a) in humans. Metoprolol and fluorescein were used as marker compounds of high and low permeability, respectively. The effective permeability (P_{eff}) results showed that stavudine and zidovudine have high permeability characteristics while lamivudine presented the lowest result. From P_{eff} values obtained in rats, the $P_{eff,humans}$ and F_a were calculated. The use of SPIP in rats and calculations for absorption prediction in humans may indicate the transport mechanisms and/or pre-systemic metabolism involved on permeation processes of drugs, since this model is the closest to *in vivo* conditions.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Oral administration is the main route for drugs due to convenience, safety, low cost and great acceptance by patients [1].

The efficacy and safety of drugs are associated with bioavailability, which is a biological property related to rate and extent of absorption. Oral absorption depends on drug release from a dosage form (dissolution/solubility) in luminal fluids and its permeability through intestinal membranes. Thus, solubility and permeability processes are fundamental for absorption [2,3].

Based on solubility and permeability characteristics, the Biopharmaceutical Classification System (BCS) was proposed by Amidon and colleagues (1995) and it has been used as a tool for new drugs and new pharmaceutical developments. The BCS classifies drugs into four classes: class I (high solubility and high permeability), class II (low solubility and high permeability), class III (high solubility and low permeability) and class IV (low solubility and low permeability) [2,4,5]. Also, the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) was proposed as a tool to predict the disposition of a drug. In this system, compounds can be classified into four classes according to their characteristics of solubility and metabolism. The interaction between drugs and transporters can be evaluated as well [6].

In 2000, the Food and Drug Administration Agency (FDA) published a guideline based on BCS for waiver of bioavailability and *in vivo* bioequivalence studies for class I drugs. For biopharmaceutical classification purposes, the FDA recommends methods that can predict the absorption extension of an oral drug product [3].

Permeability can be directly determined by measuring the rate of mass transfer across human intestinal membrane or indirectly by estimating the extent of drug absorption in pharmacokinetics studies in humans in comparison with reference dose administered by intravenous route. Alternatively, different systems can be used for prediction of oral drug absorption in humans and to classify drugs according to permeability characteristics, such as: artificial membranes and cellular cultures (*in vitro* methods), *ex vivo* studies using isolated intestinal segments (*ex vivo* methods) and intestinal perfusion studies (*in situ* methods) [3].

The FDA guidance recommends *in situ* perfusion studies as a tool for classifying a drug according to its permeability characteristics based on the BCS and this method can be applied for bioavailability purposes of drugs orally administered. The method is widely used because it is simple and presents low cost and surgical easiness in comparison with *in vivo* studies [3,7–10].

Different techniques have been studied for absorption of drugs using *in situ* perfusion, such as: *in situ* Thiry-Vella fistula, *in situ* intestinal single-pass perfusion, *in situ* intestinal recirculating perfusion, *in situ* intestinal perfusion with venous sampling, *in situ* vascularly perfused intestine-liver and *in situ* Loc-I-Gut [11].

* Corresponding author.

E-mail address: chserra@usp.br (C.H.R. Serra).

RA, C.H.R.; CHANG, K.H.; DEZANI, T.M.; PORTA, V.; STORPIRTIS, S.
 Dissolution efficiency and bioequivalence study using urine data from healthy
 volunteers: a comparison between two tablet formulations of cephalexin.
 Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.51, n.2, p.383-392, 2015.

BJPS

Brazilian Journal of
 Pharmaceutical Sciences
 vol. 51, n. 2, apr./jun., 2015
<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502015000200016>

Dissolution efficiency and bioequivalence study using urine data from healthy volunteers: a comparison between two tablet formulations of cephalexin

Cristina Helena dos Reis Serra^{1,*}, Kyung Hee Chang², Thaisa Marinho Dezani¹, Valentina Porta¹,
 Sílvia Storpirtis¹

¹Department of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, ²Libbs Pharmaceutical, São Paulo, SP, Brazil

The aim of the present study was to assess the bioequivalence of two cephalexin tablet formulations available in the Brazilian market (product A as reference formulation and product B as test formulation). Dissolution efficiency (DE%) was calculated for both formulations to evaluate their *in vitro* biopharmaceutical features. The oral bioequivalence study was performed in twenty-four healthy volunteers in a crossover design. Single oral dose (tablet containing 500 mg of cephalexin) of each product was administered with two weeks of washout period. Urinary concentrations of cephalexin were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) method and pharmacokinetics parameters were estimated by urinary excretion data. The bioequivalence was determined by the following parameters: the cumulative amount of cephalexin excreted in the urine, the total amount of cephalexin excreted in the urine and the maximum urinary excretion rate of cephalexin. DE values of immediate-release cephalexin tablets (500 mg) were 68.69±4.18% for product A and 71.03±6.63% for product B. Regarding the dissolution test of the two brands (A and B) analysed, both were in compliance with the official pharmacopeial specifications, since the dissolution of both formulations was superior to 80% of the amount declared in the label after 45 minutes of test (A=92.09%±1.84; B=92.84%±1.08). The results obtained indicated that the products A and B are pharmaceutical equivalents. Confidence intervals for the pharmacokinetic parameters were in compliance with the international standards, indicating that products A and B can be considered bioequivalents and, therefore, interchangeable.

Uniterms: Tablets/formulations/bioequivalence study. Cephalexin/dissolution efficiency.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a bioequivalência de duas formulações de cefalexina disponíveis no mercado brasileiro (produto A como formulação referência e produto B como formulação teste). A eficiência de dissolução (DE%) foi calculada para ambas as formulações para avaliar suas características biofarmacêuticas. O estudo de bioequivalência oral foi realizado em vinte e quatro voluntários sadios utilizando um desenho cruzado. Uma dose oral única (comprimido contendo 500 mg de cefalexina) de cada produto foi administrada com um período de *washout* de duas semanas. Concentrações urinárias de cefalexina foram mensuradas por método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os parâmetros farmacocinéticos foram estimados por dados de excreção urinária. A bioequivalência foi determinada pelos seguintes parâmetros: quantidade acumulada da cefalexina excretada na urina, quantidade total da cefalexina excretada na urina e a taxa de excreção máxima da cefalexina. Os valores de DE dos comprimidos de liberação imediata de cefalexina (500 mg) foram 68,69±4,18% para o produto A e de 71,03±6,63% para o produto B. Com relação ao teste de dissolução das duas marcas analisadas (A e B), ambas apresentaram-se de acordo com as especificações farmacopéicas, uma vez que a dissolução de ambas formulações foi superior a 80% da quantidade declarada após 45 minutos de teste (A=92,09%±1,84; B=92,84%±1,08). Os resultados obtidos indicaram que os produtos A e B são equivalentes farmacêuticos. Os intervalos de confiança para os parâmetros farmacocinéticos estavam de acordo com os padrões internacionais, demonstrando que os produtos A e B podem ser considerados bioequivalentes e, portanto, intercambiáveis.

Unitermos: Comprimidos/estudo de bioequivalência. Cefalexina/eficiência de dissolução.

*Correspondence: C.H.R. Serra, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Av. Prof. Lineu Prestes, n. 580, 05508-000 – São Paulo – SP, Brasil. E-mail: chserra@usp.br

JUNIOR, J.B.S.; DEZANI, T.M.; DEZANI, A.B.; SERRA, C.H. Evaluating potential P-gp substrates: Main aspects to choose the adequate permeability model for assessing gastrointestinal drug absorption. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.15, p.858-871, 2015.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

858

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2015, 15, 858-871

Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption

João Batista da Silva Junior, Thaisa Marinho Dezani, André Bersani Dezani and Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580-BL. 13, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Abstract: The success of an oral drug route administration depends on many factors that interfere in its bioavailability, therapeutic efficacy and clinical safety. In human cells, ATP-dependent efflux transporter proteins, such as P-glycoprotein (P-gp), BCRP and MRP2, reduce the absorption of drugs. A tiered approach chosen to evaluate drugs as substrates or inhibitors of efflux pumps, particularly P-gp, should be carefully selected, since each study method has advantages and intrinsic limitations to their processes. Depending on the adopted study conditions, the results may not correspond to the real characteristics of the drug regarding to its modulation by specific efflux proteins. This mini-review aims at summarizing the role of P-gp in the drugs oral absorption and correlating some of the most used permeability methods to determine the drug condition as P-gp substrate. Studies about P-gp have shown that it is a dynamic protein, facilitating secretion of endogenous compounds, as aldosterone, and protecting cells against xenobiotics. Different efflux assays are employed to evaluate drugs as P-gp substrates. In an initial planning, MDCK-MDR1 tend to be the chosen method for efflux studies due its ability of express P-gp, followed by studies conducted in Caco-2 models. However, it is necessary to evaluate the advantages and disadvantages of each method to generate sound results and to set the correlation *in vitro* x *in situ* x *in vivo*.

Keywords: Caco-2, drug permeability, efflux, *ex vivo*, *in situ*, *in vitro*, MDCK, MDCK-MDR1, P-glycoprotein.

INTRODUCTION

In clinical routine, oral drug administration is the preferred route due to its convenience, safety, efficiency, with minimal discomfort to the patient, and still with relatively low production costs. Most drugs marketed worldwide are available as oral dosage forms. However, one of the prerequisites for successful therapy is sufficient intestinal absorption to ensure that the drug is available at its intended target site. Nevertheless, drug absorption in the gastrointestinal tract is complex and may be influenced by several factors that impact in drug dissolution/solubility and permeability, such as drug aqueous solubility, gastric emptying time, intestinal motility, intestinal pH, mechanisms involved in the transport of drugs across the membranes of enterocytes, pre-systemic drug metabolism and pharmaceutical excipients [1-7].

Drug absorption occurs mainly in small intestine, especially in duodenum and proximal jejunum portions, through enterocytes [8-12]. Enterocytes are highly polarized cells, i.e. they have an apical side (mucosal or intestinal

lumen), which faces the lumen of the intestine, and a basolateral side (serosal). Intercellular complexes called tight junctions connect the enterocytes. Lipid characteristic of enterocytes membranes and tight junctions are the main physical barriers for drug permeation [12-14]. Drug absorption across the intestinal membrane is a dynamic and complex multi-pathway process, and it may occur through one or more mechanisms by passive diffusion or active transport (Fig. 1). Passive diffusion is the most common mechanism involved in absorption across the intestinal membrane and it is divided into two pathways: transcellular, through the membrane of enterocytes; and paracellular, through the aqueous pores at the tight junctions. The active transport pathway is mediated by transporters and is divided into active influx and efflux [12, 15-18].

Transcellular passive absorption (Fig. 1, route 3) occurs across the lipid bilayer of enterocytes. It is a concentration gradient-driven mass transport across the cell membrane, and it is a non-consuming energy process. This pathway follows Fick's law, whereby the absorption rate is proportional to the drug concentration and the surface area. Generally, it depends on the uncharged fraction of the molecule taking into consideration the pKa and the physicochemical properties of the drug, such as lipophilicity (log P/log D), polar surface area, hydrogen bond number and molecular

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580 BL. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; Tel: +55 11 30913623; Fax: + 55 11 38154418; E-mail: chserra@usp.br

DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; CAFFARO, A.M.; REIS, J.M.; SERRA, C.H.R. Equilibrium solubility *versus* intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.49, n.4, 2013.

BJPS

Brazilian Journal of
Pharmaceutical Sciences
vol. 49, n. 4, oct./dec., 2013

Equilibrium solubility *versus* intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification

André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Arthur Massabki Caffaro,
Juliana Mazza Reis, Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

---

Solubility and dissolution rate of drugs are of major importance in pre-formulation studies of pharmaceutical dosage forms. The solubility improvement allows the drugs to be potential biowaiver candidates and may be a good way to develop more dose-efficient formulations. Solubility behaviour of lamivudine, stavudine and zidovudine in individual solvents (under pH range of 1.2 to 7.5) was studied by equilibrium solubility and intrinsic dissolution methods. In solubility study by equilibrium method (shake-flask technique), known amounts of drug were added in each media until to reach saturation and the mixture was subjected to agitation of 150 rpm for 72 hours at 37 °C. In intrinsic dissolution test, known amount of each drug was compressed in the matrix of Wood's apparatus and subjected to dissolution in each media with agitation of 50 rpm at 37 °C. In solubility by equilibrium method, lamivudine and zidovudine can be considered as highly soluble drugs. Although stavudine present high solubility in pH 4.5, 6.8, 7.5 and water, the solubility determination in pH 1.2 was not possible due stability problems. Regarding to intrinsic dissolution, lamivudine and stavudine present high speed of dissolution. Considering a boundary value presented by Yu and colleagues (2004), all drugs studied present high solubility characteristics in intrinsic dissolution method. Based on the obtained results, intrinsic dissolution seems to be superior for solubility studies as an alternative method for biopharmaceutical classification purposes.

Uniterms: Drugs/solubility. Drugs/dissolution rate. Intrinsic dissolution/method/biopharmaceutical classification. Biopharmaceutical Classification System.

A solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos são de grande importância em estudos de pré-formulação de formas farmacêuticas. A melhora na solubilidade permite que os fármacos sejam candidatos potenciais à bioisenção, podendo ser uma boa maneira para desenvolver formulações dose-eficientes. O comportamento de solubilidade da lamivudina, estavudina e zidovudina em solventes individuais (sob faixa de pH 1,2 a 7,5) foi estudado pelos métodos de solubilidade em equilíbrio e dissolução intrínseca. No estudo de solubilidade pelo método do equilíbrio (método de agitação de frascos), conhecidas quantidades do fármaco foram adicionadas em cada meio até atingirem a saturação e a mistura foi submetida à agitação de 150 rpm por 72 horas a 37 °C. No ensaio de dissolução intrínseca, conhecida quantidade de cada fármaco foi comprimida na matriz do aparato de Wood e submetida à dissolução em cada meio com agitação de 50 rpm a 37 °C. No método de solubilidade em equilíbrio, a lamivudina e a zidovudina podem ser consideradas como fármacos altamente solúveis. Embora a estavudina apresente alta solubilidade nos meios pH 4,5, 6,8, 7,5 e água, a determinação da solubilidade em pH 1,2 não foi possível devido a problemas de estabilidade. Com relação à dissolução intrínseca, a lamivudina e a estavudina apresentaram alta velocidade de dissolução. Considerando o valor limite apresentado por Yu e colaboradores (2004), todos os fármacos apresentaram características de alta solubilidade no método de dissolução intrínseca. Com base nos resultados obtidos, a dissolução intrínseca parece ser superior para os estudos de solubilidade como um método alternativo para o propósito de classificação biofarmacêutica.

Unitermos: Fármacos/solubilidade. Fármacos/taxa de dissolução. Dissolução intrínseca/método/classificação biofarmacêutica. Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

---

*Correspondence: C. H. R. Serra. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, n.580, 05508-000 – São Paulo – SP, Brasil. E-mail: chserra@usp.br; andredezani@usp.br

DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; CAFFARO, A.M.; REIS, J.M.; SERRA, C.H.R. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different *ex vivo* method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.67, p.194-202, 2013.

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 67 (2013) 194–202

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpharmtox

Original article

Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different *ex vivo* method in Franz cells

André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Arthur Massabki Caffaro, Juliana Mazza Reis, Cristina Helena dos Reis Serra*

Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2012

Accepted 8 January 2013

Available online 19 January 2013

Keywords:

Permeability

Franz cells

Lamivudine

Zidovudine

Biopharmaceutical Classification System

Methods

ABSTRACT

Introduction: The major processes that control the absorption of orally administered drugs are dissolution and gastrointestinal permeation. These processes depend on two main properties: solubility and permeability. Based on these characteristics, the Biopharmaceutical Classification System (BCS) was proposed as a tool to assist in biowaiver and bioavailability prediction of drugs.

Methods: The purpose of the present study was to evaluate the permeability of lamivudine (3TC) and zidovudine (AZT) using a different *ex vivo* method in Franz cells. A segment of jejunum was inserted in a Franz cells apparatus, in order to assess drug permeability in the apical–basolateral (A–B) and basolateral–apical (B–A) directions. Each drug was added to the donor chamber, collected from the acceptor chamber and analyzed by HPLC. Fluorescein (FLU) and metoprolol (METO) were used as low and high permeability markers, respectively.

Results: The apparent permeability (P_{app}) results for the A–B direction were: $P_{app\ FLU\ A-B} = 0.54 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $P_{app\ METO\ A-B} = 7.99 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $P_{app\ 3TC\ A-B} = 4.58 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $P_{app\ AZT\ A-B} = 5.34 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. For the B–A direction, the P_{app} results were: $P_{app\ FLU\ B-A} = 0.56 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $P_{app\ METO\ B-A} = 0.25 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $P_{app\ 3TC\ B-A} = 0.24 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $P_{app\ AZT\ B-A} = 0.19 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Discussion: For the A–B direction, the P_{app} results of fluorescein and metoprolol show low and high permeability, respectively, indicating that the membranes were appropriate for permeability studies. For the A–B direction, the P_{app} results of 3TC and AZT suggest that these antiretroviral drugs have permeability values close to metoprolol. Nevertheless, for the B–A direction the P_{app} results do not suggest efflux mechanism for any of the drugs. Thereby, the different *ex vivo* methods using Franz cells can be successfully applied in drug permeability studies, in particular for drug biopharmaceutical classification.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Oral drug administration is the most common route for drug intake, mainly due to the convenience, safety, low cost and good acceptance by patients (Balimane, Chong, & Morrison, 2000; Corá et al., 2011; Lennernäs & Abrahamsson, 2005; Pretorius & Bouic, 2009).

The active ingredient in a solid dosage form must be soluble in biological fluids and should be able to cross the biological membrane in physiological conditions (Balimane et al., 2000; Dahan, West, & Amidon, 2009). Thus, solubility and permeability characteristics are important processes for drug absorption and, consequently, for its bioavailability (Amidon, Lennernäs, Shah, & Crison, 1995).

Drug absorption takes place especially in the small intestine, mostly in the duodenum and proximal jejunum portions, through enterocytes (Balimane et al., 2000; Fagerholm, Johansson, & Lennernäs,

1996; Hillgren, Kato, & Borchardt, 1995; Lennernäs, 1998). These cells are connected to each other by tight junctions, which are considered the main physical barriers for drug permeation, together with lipid membrane characteristics (Artursson, Ungell, & Löfroth, 1993; Deferme, Annaert, & Augustijns, 2008).

Absorption of drugs is a dynamic and complex process that occurs by different pathways, such as: passive transcellular and paracellular, active uptake transporters (including influx and efflux mechanisms) and endocytosis (Balimane, Han, & Chong, 2006; Balimane et al., 2000; Cook & Shenoy, 2003; Corá et al., 2011; Deferme et al., 2008; Kerns et al., 2004). About 80–95% of drugs are absorbed by passive diffusion and this route is affected by physicochemical properties such as lipophilicity, hydrogen bonding, pK_a , and molecular weight (Cao et al., 2006; Kerns et al., 2004).

Therefore, based on aqueous drug solubility and permeability, the Biopharmaceutical Classification System (BCS) was proposed by Amidon et al. (1995). This system allows the classification of drugs into four classes: high solubility and high permeability (class I), low solubility and high permeability (class II), high solubility and low permeability (class III) and, low solubility and low permeability (class IV).

* Corresponding author at: University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30913623; fax: +55 11 38154418.

E-mail address: chserra@usp.br (C.H.R. Serra).

REIS, J.M.; DEZANI, A.B.; PEREIRA, T.M.; AVDEEF, A.; SERRA, C.H.R.
 Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and
in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *European
 Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.48, p.781-789, 2013.

European Journal of Pharmaceutical Sciences 48 (2013) 781–789

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and
in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum

J.M. Reis^{a,1}, A.B. Dezani^a, T.M. Pereira^a, A. Avdeef^b, C.H.R. Serra^{a,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 13, 05508-900 São Paulo, Brazil

^b In-ADME Research, 20 Second St., Cambridge, MA 02141, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2012

Received in revised form 27 November 2012

Accepted 17 December 2012

Available online 5 January 2013

Keywords:

Permeability

Lamivudine

PAMPA

In situ perfusion

Franz cell

Jejunum *ex vivo*

ABSTRACT

In order to reach the bloodstream and thus the target receptor, an orally-administered drug must first cross the intestinal barrier, which can occur via a paracellular, passive transcellular, or carrier-mediated uptake and/or efflux process (active or concentration gradient-driven). Our work aimed to explore the transport mechanism of the antiretroviral lamivudine (deoxycytidine nucleoside analogue), using a three-part strategy: *in vitro*, an *ex vivo* and an *in situ* method, represented by PAMPA, rat jejunum patches and rat Single Pass Intestinal Perfusion (SPIP), respectively. The determined permeability coefficients were compared with those from a published Caco-2 and MDCK study. Computational prediction of human jejunal permeability was explored, using various non-human permeability coefficients as descriptors. The *ex vivo* technique was performed in Franz-type diffusion cells, mounted with male Wistar rat jejunum segment patches. PAMPA was performed with an acceptor solution simulating the binding of serum proteins, an artificial membrane impregnated with egg lecithin/cholesterol and a gradient of pH between donor and acceptor solutions. The SPIP was conducted by proximal jejunum cannulation and drug perfusion in a constant flow rate of 0.2 mL/min. The outcomes of our studies showed the following predicted pattern for lamivudine effective jejunal permeability: $P_{eff}^{proximal A \rightarrow B} > P_{eff}^{SPIP} > P_{eff}^{proximal B \rightarrow A} > P_{Caco-2} \approx P_{MDCK} \approx P_{eff}^{PAMPA}$, strongly suggesting that this compound has carrier-mediated uptake as its dominant transport mechanism. Notwithstanding, Caco-2 cells may indicate an under-expression of uptake transporters and possibly an over-expression efflux transporters, compared to that found in the rat jejunum.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Identifying compounds with sufficient membrane permeability is an important goal during lead optimization of new chemical entities (Li et al., 2008). Following oral administration, a dissolved drug may cross the intestinal barrier by a single or a combination of several pathways, including passive paracellular diffusion, passive transcellular diffusion, and/or carrier-mediated uptake/efflux (active or concentration gradient-driven), before entering systemic circulation (Fujikawa et al., 2005; Shugarts and Benet, 2009).

There are many known uptake transporters, whose substrates include amino acids, peptides, and nucleosides. Efflux transporters include the well-studied P-glycoprotein (P-gp), which is responsible for secreting drugs out of the cell (Kim and Benet, 2004). P-gp substrates are generally hydrophobic molecules, often cationic (Giacomini et al., 2010). Other efflux transporters comprise multi-drug resistance proteins (MRPs) and breast cancer-related protein (BCRP) (Chan et al., 2004; Quevedo et al., 2011).

Current approaches to characterize drug permeability draw on various models: octanol–water partition coefficients, artificial membrane permeability, *ex vivo/in vitro* (tissue- or cultured cell-based), *in situ* and *in vivo* intestinal perfusion, as well as *in silico* methods (Bohets et al., 2001).

The established *in vitro* permeability assay in pharmaceutical research is based on cellular monolayer systems, such as Caco-2 and MDCK. The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) has evolved as an adjunct to the cellular methods (Kansy et al., 1998). PAMPA is a low-cost, high-throughput permeability method. Since the majority of drugs are thought to be absorbed primarily or partially by passive transport, the rate of permeation through a simple artificial membrane is likely to provide an indication of a drug's absorption potential (Kansy et al., 1998; Balimane et al., 2000; Avdeef et al., 2005; Fujikawa et al., 2005; Masungu et al., 2008; Li et al., 2008; Nirasay et al., 2011; Buckley et al., 2012).

Ex vivo assays using excised rat intestinal segment patches have the advantage of expressing the vast majority of influx and efflux transporters found *in vivo*. Rat intestinal segment patches can be used to establish intestinal correlation between rats and humans (Tukker, 2000; Trapani et al., 2004; Zakelj et al., 2006; Cao et al., 2008; Pretorius and Bouic, 2009). Models which employ vertical

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913623; fax: +55 11 38154418.

E-mail addresses: ju_gene@hotmail.com (J.M. Reis), chserra@usp.br (C.H.R. Serra).

¹ Tel.: +55 11 987825524.

ANEXO F

Artigos em elaboração

Biopharmaceutics Classification System (BCS) and Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Applications in drug development and biowaiver processes

Thaïsa M. Dezani^{*a}, André B. Dezani^{*a}, Leslie Z. Benet^b, Cristina H.R. Serra^a;

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

The oral administration is the main route for drug intake due to acceptance by patients, convenience and low costs. After oral administration, the drug should be solubilized in the liquids of the gastrointestinal tract (GIT) and be able to cross the gut wall in order to reach the systemic circulation and, consequently, perform its pharmacological action. Thus, solubility and permeability characteristics are directly related to bioavailability, which corresponds to a biological property related to the rate and extent of drug's absorption from a pharmaceutical form and it becomes available at the site of action. Based on that, Amidon and colleagues proposed the Biopharmaceutics Classification System (BCS) as a tool for drug classification according to the solubility and the permeability. These characteristics have gained notoriety since the publication of the SCB-based guidance by the Food and Drug Administration (FDA). Since the solubility corresponds to a mandatory step for absorption processes related to ADME properties (absorption, distribution, metabolism, excretion), another tool called Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) was proposed by Wu and Benet and this system considers solubility and metabolism for the classification of drugs. Since then, many studies have been developed regarding the characterization of solubility, permeability and metabolism in order to clarify events related to the pharmacokinetics of the drugs. Thus, this study aimed to compare BCS and BDDCS and discuss their important roles in the development of new drugs, in the biowaiver processes in the AMDME scope. Some studies in the literature describe both systems, but there is a need to evaluate the importance of each one and their relationships between them. While the BCS corresponds to a more objective tool, the BDDCS is considered more complex and is related to several parameters not considered by the BCS. Although both systems contemplate solubility, the difference is related to the characteristics of permeability and the extent of metabolism, which correlate to some drugs already studied in the literature. Thus, BCS and BDDCS present themselves as important complementary tools that help in understanding the behavior of orally administered substances.

Keywords: BCS, BDDCS, biowaiver, solubility, permeability, metabolism.

In vitro, ex vivo and in situ methods applied in the evaluation of intestinal drug permeability

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Leslie Z. Benet^b, Cristina H. R. Serra^a

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Since the presentation of the Biopharmaceutics Classification System (BCS) and its application to biowaiver processes, many permeability studies have been developed with the aim of predicting *in vivo* absorption. The permeability, considered by BCS is one of the factors responsible for the bioavailability of orally administered drugs. However, many other parameters interfere in the bioavailability, such as drug metabolism. Thus, the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) considers the solubility and metabolism characteristics of the substances. The prediction of *in vivo* absorption has been a challenge since the establishment of BCS and BDDCS and many methods used for the permeability evaluation are currently available. Absorption is a complex process influenced by several factors including the physicochemical characteristics of drugs, transport mechanisms and metabolic activity in the gastrointestinal tract (GIT). Thus, with the experiments carried out in *in vitro* and *ex vivo* models it is possible to understand the influence of excipients on the permeability processes, especially when absorption promoters are used in the pharmaceutical forms. It is extremely important to know each method available for the studies of permeability and to consider several parameters such as the influence of enzymes and / or carriers of influx and efflux. In addition, each model has advantages and disadvantages, which must be carefully considered for the correct interpretation of results to their applications in *in vivo* situations. Based on that, this work aimed to present a review of the methods currently used for the permeability studies by *in vitro* and *ex vivo* models, as well as, provides guidelines to the researchers for the selection of the most appropriate model in drug permeability evaluation.

Keywords: permeability, *in vitro* methods, *ex vivo* methods, absorption, efflux transport.

Main aspects related to the intestinal metabolism and its influence in drug absorption

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Hideaki Okochi^b, Cristina H.R. Serra^a, Leslie Z. Benet^b

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Currently, many of the pharmaceutical products available on the market are directed to oral administration because of their safety, convenience, low costs and great acceptance by the patients. Thus, orally administered drugs depend on the steps of solubility and permeability in the gastrointestinal tract (GIT) to have adequate oral bioavailability. Solubility is considered an important and mandatory step for drug transport through the gut wall, since the permeability step is complex and involves several mechanisms. Based on the characteristics of solubility and permeability, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed as a tool for the drug classification and for the development of new compounds and new dosage formulations. Another tool called Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) was proposed in order to classify drugs according to their characteristics of solubility and metabolism. Thus, the bioavailability may be influenced not only by the solubility and permeability, but also by the pre-systemic metabolism that often occurs in enterocytes. The aim of the present study was to present the importance of intestinal metabolism and its impact in absorption processes, as well as to discuss the most used methods to identify if a drug is a substrate of CYP3A enzymes. Currently, few studies have addressed the importance of intestinal metabolism and its influence on processes related to the ADME properties (absorption, distribution, metabolism and elimination). However, some methods may be employed to assess whether intestinal metabolism is related to the low bioavailability observed for some drugs. Based on that, assays in *in vitro*, *ex vivo* and *in situ* models are the most used for this purpose.

Keywords: intestinal metabolism, enterocytes, CYP3A, BCS, BDDCS.

Evaluation of the drug-efflux interaction of antiretroviral drugs through *in vitro* MDCK-MDR1, *ex vivo* and *in situ* models

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Cristina H.R. Serra^a; Leslie Z. Benet^b

^a Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

For orally administered drugs, the determination of permeability characteristics and mechanisms related to the absorption processes has become relevant since such factors interfere directly on bioavailability. The influence of efflux transport, caused mainly by the P-glycoprotein (P-gp), is considered important in the development and characterization of drugs, since this transporter may be related to the incomplete *in vivo* bioavailability observed for some drugs. Different methods have been employed for drug efflux studies, including *in vitro* models using MDCK-MDR1 cell cultures and *ex vivo* with the use of intestinal segments from rats in Franz cells. Thus, the present work aimed to evaluate the influence of the efflux mechanism caused by P-gp in the permeability of antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine. *In vitro* models using MDCK-MDR1 cells and *ex vivo* method with the use of intestinal segments in Franz cells were employed in the efflux studies. In MDCK-MDR1 cells, GG918 was used as a P-gp inhibitor. The experiments were conducted in the apical-basolateral (A→B) and basolateral-apical (B→A) directions in the presence and absence of the inhibitor. For experiments in *ex vivo* model, intestinal segments of jejunum were mounted into the Franz cells device and verapamil was employed as a P-gp inhibitor. In the MDCK-MDR1 assays, the B→A / A→B ratios were: 1.7 for stavudine, 2.0 for lamivudine and 3.2 for zidovudine. In the *ex vivo* model, a comparison of the results obtained in the absence and presence of verapamil indicated a significant increase in the permeability of the three antiretroviral drugs when the inhibitor was used: from 15.6×10^{-6} to 42.5×10^{-6} cm/s for stavudine, 12.6×10^{-6} for 37.5×10^{-6} cm/s for lamivudine and 25.4×10^{-6} for 56.6×10^{-6} cm/s for zidovudine. Based on that, the *ex vivo* model with the use of intestinal segments in Franz cells was adequate in evaluating the efflux mechanism of antiretroviral drugs, which was confirmed by the MDCK-MDR1 studies. Thus, based on the results obtained, the antiretroviral drugs studied showed a significant interaction with P-gp.

Keywords: MDCK-MDR1, Franz cells, antiretroviral drugs, P-gp, efflux.

Evaluation of the CYP3A influence in the intestinal permeability of antiretroviral drugs by in vitro microsomes and ex vivo and in situ models

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Cristina H.R. Serra^a, Leslie Z. Benet^b

^a Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

For adequate oral absorption, the drug contained in a pharmaceutical dosage form must be firstly solubilized in the liquids contained in the gastrointestinal tract (GIT). Thereafter, the substance should be able to cross the gut wall, reach the bloodstream and its site of pharmacological action. Thus, the solubility and permeability characteristics of a drug are, among other factors, critical for *in vivo* bioavailability. Based on these two properties, the Biopharmaceutics Classification System (BCS) was proposed as an important tool that assists in the prediction of substance absorption, in the development of new drugs and new formulations. In addition to solubility and permeability, metabolism is also a relevant factor for bioavailability and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) has been proposed as a complementary tool that helps in understanding the behavior of the drug *in vivo*. BDDCS classifies drugs based on their solubility and metabolism characteristics. The intestine is one of the major extrahepatic sites found in the body capable of expressing different enzymes, including CYP3A4 and CYP3A5. Pre-systemic intestinal metabolism is considered to be extremely important in the absorption processes and, in some cases, is responsible for the low oral bioavailability of certain drugs. This study aimed to evaluate the influence of presystemic metabolism on the absorption of antiretroviral drugs (stavudine, lamivudine and zidovudine), since these substances present variations in *in vivo* bioavailability that should be investigated. In this study, intestinal metabolism was evaluated by the use of intestinal segments in Franz cells with the use of CYP3A enzyme inhibitor (ketoconazole). In a complementary way, studies were carried out in microsomes with the purpose of evaluating the metabolized percentage of each drug. Assays performed in intestinal segments and microsomes have not demonstrated the significant influence of CYP3A enzymes in antiretroviral metabolism processes. Thus, the results indicated that oral absorption of these substances is not limited by the CYP3A enzymes, which suggest more specific assays to understand the ratios related to the variable bioavailability values of the antiretroviral drugs evaluated.

Keywords: pre-systemic metabolism, CYP3A, microsomes, enterocytes, absorption.

Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of lamivudine, stavudine and zidovudine in samples from the Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) studies

Thaís Marinho Dezani, André Bersani Dezani, Cristina Helena dos Reis Serra*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo - Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bl. 13, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author:

Cristina Helena dos Reis Serra, Ph.D.

Tel: +55 11 30913623; Fax: +55 11 38154418; E-mail: chserra@usp.br

A B S T R A C T

A simple reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method with ultraviolet (UV) detection is proposed for the simultaneous quantification of lamivudine (3TC), stavudine (d4T) and zidovudine (AZT) in samples from the Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) studies. The method was developed and validated and it demonstrated effective in determinations of these three antiretroviral drugs in the samples (perfusate). The chromatographic analysis were performed using a C18 Phenomenex® column (150 mm X 4.6 mm X 5 µm) and didanosine (ddI) as internal standard (I.S). The validation was based on ICH guideline and the following parameters were considered: accuracy, precision, linearity and selectivity. The limits of detection (LOD) were 2.39 µg/mL for 3TC, 0.32 µg/mL for d4T and 3.65 µg/mL for AZT and the limits of quantification (LOQ) were 7.26 µg/mL for 3TC, 0.98 µg/mL for d4T and 11.06 µg/mL for AZT. Repeatability and intermediate precision ranged from 1.05 to 1.31 and 1.50 to 1.87, respectively, and are expressed as percent of relative standard deviation (RSD). Based on these results, the validated and developed RP-HPLC method can be used for simultaneous determination of 3TC, d4T and AZT in samples from the SPIP studies. Furthermore, this method is simple and adequate for measurements of drugs in perfusate since the administration of antiretroviral drugs is made in combination. Besides, this work can be used as a start protocol for the development of similar method by adding new drugs in the same conditions presented in our study.

Keywords: antiretroviral drugs; chromatographic method; RP-HPLC; permeability; SPIP

Development and validation of the LC-MS/MS chromatographic method for the quantification of antiretroviral drugs in metabolism, efflux and in situ studies

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Hideaki Okochi^b, Cristina H.R. Serra^a, Leslie Z. Benet^b

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

When drugs are orally administered, several factors may influence absorption processes, such as the efflux mechanisms caused by P-glycoprotein (P-gp) and intestinal metabolism caused by CYP enzymes present in enterocytes. Both P-gp and CYP enzymes may interfere with the bioavailability of some drugs. Thus, efflux and metabolism studies have been reported in the literature to evaluate if a substance is a P-gp and/or CYP substrate. The widely used models include transport studies performed on cell cultures and metabolism assays in microsomes. The mechanisms of efflux and metabolism are not completely elucidated for drugs that have variable bioavailability, such as the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine. Thus, trials to investigate the involvement of these two factors are necessary. In addition, the quantification of the samples must be performed by a validated bioanalytical method that ensures the reliability of the acquired data. Based on that, the present study aimed to validate the chromatographic method in HPLC-MS/MS for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine, as well as the markers metoprolol and ranitidine used in the efflux transport and metabolism assays. The conditions used included: Sinergi polar-RP 80 Å chromatographic column (4.6 x 75 mm, 4 µm), room temperature at 20°C, electrospray source in the turbo spray ionization mode with 5 kV voltage and source temperature of 400°C. The mobile phase consisted of a mixture of ammonium acetate buffer, ultrapurified water and acetonitrile in different proportions. The retention times were: 2.9 minutes for lamivudine, 2.7 minutes for stavudine, 3.3 minutes for zidovudine, 3.5 minutes for metoprolol, 2.9 minutes for ranitidine and 4.5 minutes for carbamazepine (internal standard). The concentration range was 0.5 to 1000 nM and the method showed good linearity (greater than 0.99 for all substances). The detection limits obtained were in the range of 0.01 nM to 0.38 nM and the other parameters were presented according to the recommendations in the specific literature. Thus, the validated chromatographic methods showed to be suitable for the proposed purposes.

Keywords: permeability, chromatography, validation, antiretroviral drugs, LC-MS/MS

Development and validation of the chromatographic method for the simultaneous quantification of stavudine, lamivudine and zidovudine in *ex vivo* permeability studies

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Cristina H.R. Serra^a

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Drugs that are orally administered need to have adequate solubility and permeability characteristics for absorption occurs through the gastrointestinal tract (GIT). Many studies described in the literature present different models that can be used for the characterization of drugs in terms of permeability. *Ex vivo* methods in intestinal segments in diffusion chambers are suitable for studies of prediction of *in vivo* absorption. Some antiretroviral drugs, such as stavudine, lamivudine and zidovudine, have variable bioavailability values, which may be related to the transport mechanisms involved in the absorption processes. Thus, permeability studies in intestinal segments may elucidate the mechanisms of transport and the bioanalytical method is considered of great relevance to obtain the experimental results. The aim of this study was to present the validations of the chromatographic bioanalytical methods used for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine and of the markers metoprolol and ranitidine contained in samples from *ex vivo* permeability assays using intestinal segments in Franz cells. Wavelengths of 270 nm for the three antiretroviral drugs, 254 nm for metoprolol and 315 nm for ranitidine were employed. A 15 cm Phenomenex® Gemini C18 chromatographic column was used as the stationary phase, while the mobile phase pH 4.5 consisted of a mixture of phosphate buffer, acetonitrile and methanol. Retention times ranged from 4.5 to 21.5 minutes. Chromatographic methods were validated on a Merck-Hitachi equipment with UV detector and were linear for the drugs and markers in the concentration range of 25 to 3000 ng/mL. The determination coefficients were higher than 0.999 for all substances and the detection limits were in the range of 0.3 to 6.9 ng/mL. The validation parameters analyzed (specificity, linearity, reproducibility, precision, accuracy, limits of detection and quantification) were in agreement with the recommended in the literature, which allowed concluding that the developed methods are adequate in the quantification of the samples.

Keywords: permeability, chromatography, validation, antiretroviral drugs, HPLC.

Development and validation of the LC-MS/MS chromatographic method for the quantification of antiretroviral drugs in metabolism and efflux studies

André B. Dezani^{*a}, Thaisa M. Dezani^{*a}, Hideaki Okochi^b, Cristina H.R. Serra^a, Leslie Z. Benet^b

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Bioengineering & Therapeutic Sciences

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

When drugs are orally administered, several factors may influence absorption processes, such as the efflux mechanisms caused by P-glycoprotein (P-gp) and intestinal metabolism caused by CYP enzymes present in enterocytes. Both P-gp and CYP enzymes may interfere with the bioavailability of some drugs. Thus, efflux and metabolism studies have been reported in the literature to evaluate if a substance is a P-gp and/or CYP substrate. The widely used models include transport studies performed on cell cultures and metabolism assays in microsomes. The mechanisms of efflux and metabolism are not completely elucidated for drugs that have variable bioavailability, such as the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine. Thus, trials to investigate the involvement of these two factors are necessary. In addition, the quantification of the samples must be performed by a validated bioanalytical method that ensures the reliability of the acquired data. Based on that, the present study aimed to validate the chromatographic method in HPLC-MS/MS for the quantification of the antiretroviral drugs stavudine, lamivudine and zidovudine, as well as the markers metoprolol and ranitidine used in the efflux transport and metabolism assays. The conditions used included: Sinergi polar-RP 80 Å chromatographic column (4.6 x 75 mm, 4 µm), room temperature at 20°C, electrospray source in the turbo spray ionization mode with 5 kV voltage and source temperature of 400°C. The mobile phase consisted of a mixture of ammonium acetate buffer, ultrapurified water and acetonitrile in different proportions. The retention times were: 2.9 minutes for lamivudine, 2.7 minutes for stavudine, 3.3 minutes for zidovudine, 3.5 minutes for metoprolol, 2.9 minutes for ranitidine and 4.5 minutes for carbamazepine (internal standard). The concentration range was 0.5 to 1000 nM and the method showed good linearity (greater than 0.99 for all substances). The detection limits obtained were in the range of 0.01 nM to 0.38 nM and the other parameters were presented according to the recommendations in the specific literature. Thus, the validated chromatographic methods showed to be suitable for the proposed purposes.

Keywords: permeability, chromatography, validation, antiretroviral drugs, LC-MS/MS

ANEXO G

Participação em congressos internacionais

“4th International Pharma & Clinical pharmacy Congress – Poster Presentation”

“4th International Pharma & Clinical Pharmacy Congress – Oral Presentation”

“2015 AAPS Annual Meeting and Exposition – Poster Presentation”

Certificate of Presentation

This certificate acknowledge that

Thaisa Dezani

Presented a Poster Titled

**Metoprolol Permeability: Intestinal Permeation
Assessment by the Single-Pass Intestinal Perfusion
(SPIP) Method**

*2015 AAPS Annual Meeting and Exposition
October 25-29, 2015*

Alice E. Till

Alice Till, Ph.D.
AAPS President

**“6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence BA/BE
Studies Summit – Poster Presentation”**