



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA**



RAFAELA ALVES CAIXETA

Revisão narrativa sobre determinação da permeabilidade de fármacos por  
ensaios *in vitro* utilizando as células Caco-2.

Ouro Preto  
2020

RAFAELA ALVES CAIXETA

Revisão narrativa sobre determinação da permeabilidade de fármacos por ensaios *in vitro* utilizando as células Caco-2.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Ouro Preto como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jacqueline de Souza

Ouro Preto

2020

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C138r Caixeta, Rafaela Alves .  
Revisão narrativa sobre determinação da permeabilidade de fármacos por ensaios in vitro utilizando as células Caco-2. [manuscrito] / Rafaela Alves Caixeta. - 2020.  
45 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Células Caco-2. 2. Intestinos- Permeabilidade. 3. Cultura de células.  
I. Souza, Jacqueline de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMACIA  
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS FARMACEUTICAS

**FOLHA DE APROVAÇÃO****Rafaela Alves Caixeta**Revisão narrativa sobre determinação da permeabilidade de fármacos por ensaios *in vitro* utilizando as células Caco-2.

## Membros da banca

Tamires Guedes Caldeira - Doutora - CiPharma/UFOP  
Prof. André Luís Morais Ruela - Doutor - Escola de Farmácia/UFOP  
Profa. Jacqueline de Souza - Doutora- Escola de Farmácia/UFOP

## Versão final

Aprovado em 28 de agosto de 2020

## De acordo

Professora Orientadora Jacqueline de Souza



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline de Souza, COORDENADOR (A) DO PROGRAMA DE POS GRADUACAO EM CIENCIAS FARMACEUTICAS**, em 01/09/2020, às 19:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0079249** e o código CRC **3B6CC66D**.

**Referência:** Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.006207/2020-37

SEI nº 0079249

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: - www.ufop.br

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por ter me guiado e me abençoado em cada passo dessa trajetória.

À minha mãe Tânia e ao meu pai Jonas que se dedicaram integralmente a mim para que a realização desse sonho fosse possível.

Aos meus avós Maria, Marina e Joel que contribuíram com orações, ensinamentos e exemplo de vida.

Aos meus familiares e amigos por toda torcida e momentos de alegria.

Ao meu namorado Rodolfo pelo incentivo, carinho e compreensão.

Ao Pet-Física e à Formulare que me fizeram pensar além das salas de aula. A extensão mudou a minha vida.

Aos mestres e funcionários da Escola de Farmácia que tanto somaram na minha formação, em especial à minha orientadora Jacque pelo empenho e dedicação ao me direcionar para a realização de um bom trabalho.

## RESUMO

As células epiteliais intestinais, dentre as funções vitais no corpo humano, funcionam como barreira contra a permeação de substâncias tóxicas e também permitem a absorção de nutrientes essenciais. Nesse sentido de absorção, os ensaios *in vitro* utilizando membranas celulares compostas por células de adenocarcinoma de colón humano (Caco-2) se tornaram uma excelente alternativa no estudo e previsão da permeabilidade de fármacos. Desta forma, este trabalho visa discutir as distintas condições utilizadas para o cultivo das células Caco-2 e também demonstrar por meio de equações de permeabilidade aparente a sua correspondência com a permeabilidade intestinal. Assim, a revisão deste estudo foi realizada através de uma busca nas principais bases de dados online como por exemplo, Periódicos CAPES e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) onde se considerou trabalhos relacionados desde à década de 80 os quais utilizaram as monocamadas de células Caco-2 para previsão da permeabilidade intestinal de fármacos. Realizou-se o cruzamento de descritores como: permeabilidade e Caco-2, Caco-2 e cultivo celular e permeabilidade, Caco-2 e permeabilidade aparente. Ao longo deste estudo, foram considerados artigos contendo as principais condições do meio para o cultivo adequado das células Caco-2. Além disto, neste estudo foi discutida a previsão de permeabilidade de fármacos empregando equações de permeabilidade aparente (Papp). Assim, conclui-se que as quantidades e os nutrientes utilizados no meio de cultivo das células devem ser próximos aos encontrados em condições fisiológicas e que o material do suporte para formação da monocamada necessária para o estudo de permeabilidade interfere nos resultados. Assim sendo, o suporte de filtro no material Politereftalato de etileno com o tamanho do poro de 0,4  $\mu\text{m}$  foi o mais indicado. Para os estudos de permeabilidade, percebeu-se que o pH ideal varia de acordo com a acidez ou basicidade do fármaco, sendo situações isocráticas indicadas para fármacos básicos e condições gradientes para fármacos ácidos. Embora os diferentes estudos apresentem equações distintas para o cálculo de permeabilidade, estes estudos consideram as mesmas variáveis de área e concentração em função do fluxo através da monocamada proporcionando

resultados equivalentes. Por fim, o cultivo adequado das células Caco-2 fornece benefícios como investigação de mecanismos de transporte e previsão de permeabilidade de novos compostos candidatos a fármacos.

Palavras-chaves: Caco-2, permeabilidade intestinal, cultivo celular, cálculo Papp.

## ABSTRACT

Intestinal epithelial cells show different vital functions on the human body. Besides the vital functions, they act as a barrier against toxic substances and they aid at the absorption process of essential nutrients. In the absorption context, in vitro tests using cells derived from human colon adenocarcinoma (Caco-2) have become an important alternative of intestinal epithelial cells for study and prediction of the permeability of drugs. Thus the review of this study was carried out through a search in the main online database, for example, CAPES journals and Scientific Electronic Library Online (sciELO). Descriptors were cross-checked, such as: permeability and Caco-2, Caco-2 and cell culture and permeability, caco-2 and apparent permeability. Furthermore, it also presents the correspondence of Caco-2 cells permeability with intestinal epithelial cells permeability through apparent permeability equations (Papp). Related works since the 80s, which used Caco-2 cells monolayers for prediction the intestinal permeability of drugs, were listed aid by the main search engines. Throughout this study, the main experimental conditions for the proper cultivation of Caco-2 cells were listed, as well as, the prediction drug permeability through apparent permeability equations. This study observed that the number of nutrients used in the cell culture environment must be close to that found under physiological conditions and the support material for the formation of the monolayer necessary on the permeability study interferes with the results. Thus, the filter support made of polyethylene terephthalate with 0,4  $\mu\text{m}$  pore size was the most suitable. In relation to permeability conclusions, it was observed that the ideal pH over permeability researches depends of drug acidity or basicity, wherein isocratic situations for basic drugs and gradient conditions for acidic drugs. Although distinct related works have proposed different equations to calculate the permeability, they used the same variables and obtained similar results. Finally, this study concluded that the appropriate culture of Caco-2 cells can

offer some benefits, such as the study of transport mechanisms and prediction of new candidate drugs.

Keywords: Caco-2, intestinal permeability, cell culture, Papp calculus.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação do suporte para o cultivo de células Caco-2 visando os experimentos de permeabilidade. As porções apical e basolateral devem permanecer totalmente imersas no meio de cultivo. Fonte: Ciências Farmacêuticas – biofarmacotécnica (STORPIRTIS et al., 2009). ..... **20**
- Figura 2:** Figura 2: Processo de diferenciação da célula Caco-2 no suporte após o período de cultivo de 21 dias. É possível observar o aparecimento de microvilosidades após 21 dias de cultivo. Fonte: *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health – The Caco-2 Cell line* (LEA , 2015) ..... **21**
- Figura 3:** Organograma contendo as informações mais encontradas na literatura sobre o suporte de filtro. Referência: DELIE; RUBAS, 1997; LEA, 2015 Fonte: Figura elaborada pelo autor. .... **29**
- Figura 4:** Organograma evidenciando a composição do meio DMEM mais comumente encontrada. Referência: DEMARCO et al, 2003, FISHER et al, 1999, D' SOUZA et al., 2003. Fonte: Organograma elaborado pelo autor. .... **30**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resumo de informações referentes a estudos de permeabilidade de fármacos empregando células Caco-2, contendo objetivo, equação para cálculo da permeabilidade, mecanismo de transporte e breve resumo das conclusões obtidas. .....	<b>38</b>
---	-----------

## LISTA DE EQUAÇÕES

**Equação 1:** Fórmula matemática proposta por Volpe (2008) para realizar o cálculo de permeabilidade aparente utilizando as monocamadas de células Caco-2. .... **34**

**Equação 2:** Fórmula matemática proposta por Ashiru-Oredope (2011) para realizar o cálculo de permeabilidade aparente utilizando as monocamadas de células Caco-2..... **35**

**Equação 3:** Fórmula matemática proposta por Liang (2013) para realizar o cálculo de razão de permeabilidade aparente utilizando as monocamadas de células Caco-2. Esta equação indica o mecanismo de transporte da substância. .... **35**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Área da superfície no filtro
AP	Apical
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIEDE	<i>Biocoat® Intestinal Epithelium Differentiation Environment</i>
BL	Basolateral
C <sub>0</sub>	Concentração inicial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HEPES	Ácido etanossulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
MAI	Membrana Artificial Imobilizada
MAP	Membrana Artificial Paralela
MDCK	<i>Madin Darby</i> de Rim Canino
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
Papp	Permeabilidade Aparente
PDR	Razão de Permeabilidade Aparente
PET	Politereftalato de etileno
Pgp	Glicoproteína P
pH	Potencial Hidrogeniônico
RET	Resistência Elétrica Transepitelial
VR	Volume na câmara receptora

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
2.1 Método de cultivo de células Caco-2 .....	18
2.2 Estudos de permeabilidade utilizando Células Caco-2 .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Objetivo Geral .....	25
3.2 Objetivos Específicos .....	25
<b>4. MÉTODO</b> .....	<b>26</b>
4.1 Levantamentos bibliográficos sobre as condições de cultivo das células Caco-2 para o estudo de permeabilidade .....	26
4.2 Utilização de membranas formadas por células Caco-2 para o cálculo de permeabilidade aparente e análise de permeabilidade de fármacos .....	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
5.1 Levantamentos bibliográficos sobre as condições de cultivo das células Caco-2 para o estudo de permeabilidade .....	28
5.2 Análise da permeabilidade de fármacos utilizando membranas formadas por células Caco-2 .....	33
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A previsão do comportamento do fármaco após a sua administração por via oral pode ser realizada associando estudos relacionados as características do fármaco como solubilidade e permeabilidade e as características do medicamento, como por exemplo a dissolução em modelos *in vitro*. Os modelos de permeabilidade, permitem monitorar a fração do fármaco dissolvido que atravessa determinadas membranas utilizadas no modelo experimental e, dessa forma, presumir o seu comportamento no organismo humano (GINSKI; POLLI, 1999).

O epitélio intestinal funciona como uma barreira física para absorção de macromoléculas entre o lúmen do intestino e a corrente sanguínea. Essa barreira, além de impedir a entrada de compostos nocivos ao corpo humano, também tem como função permitir a passagem de substâncias essenciais ao nosso organismo (NELSON; COX, 2006).

A capacidade em atravessar a membrana está relacionada com a permeabilidade intestinal e refere-se à facilidade com que determinada substância permeia através do epitélio do intestino para que posteriormente ela possa ser absorvida. Especificamente, o transporte passivo através da membrana se dá por meio da diferença de potencial elétrico, gradiente de concentração e de pressão hidrostática (PRESS; DI GRANDI, 2008).

Os ensaios *in vitro* tem seu estudo consolidado em células, tecidos e órgãos isolados, controlados em laboratório. Estes ensaios podem ser por métodos *in vitro* biológicos e não biológicos. Os ensaios *in vitro* biológicos utilizam culturas de células, tais como, oriundas de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), *Madin Darby* de rim canino (MDCK), co-cultura de células, modelo *ex vivo*, saco intestinal invertido utilizando câmaras de difusão horizontal tipo Ussing e/ou câmaras de difusão vertical tipo Franz. Já os métodos *in vitro* não biológicos são constituídos por membranas artificiais imobilizadas (MAI) e membranas artificiais paralelas (MAP) (YOU DIM; AVDEEF; ABBOTT, 2003; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; DEZANI, 2017).

Entre os diversos modelos de ensaios *in vitro* que permitem estudar a permeabilidade intestinal têm-se as células Caco-2 que podem ser cultivadas em laboratórios e são utilizadas para simular a absorção intestinal (TANAKA et al., 1995). Diante da ampla utilização e dos resultados correlacionáveis com a permeabilidade intestinal em organismos saudáveis , os modelos *in vitro* empregando Caco-2, este trabalho tem como objetivo descrever os protocolos experimentais utilizados para a avaliação da permeabilidade de fármacos empregando ensaios *in vitro* utilizando Caco-2.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Método de cultivo de células Caco-2

As células Caco-2 são originárias de adenocarcinoma de cólon humano e chamam atenção de cientistas devido às suas semelhanças com os enterócitos encontrados no tecido epitelial saudável. Recentemente, têm-se realizado muitos estudos que correlacionam métodos *in vitro* e *in vivo* para a determinação de parâmetros biológicos. Dessa forma, as monocamadas de células Caco-2 são consideradas bons modelos para prever a absorção de fármacos (ARTURSSON; KARLSSON, 1991).

O crescimento celular e a eficiência das membranas formadas podem ser influenciados por fatores como: meio de cultivo, tempo de repique da cultura, material do suporte utilizado, nutrientes adicionados e temperatura durante o cultivo das células. Dessa forma, os meios de cultura empregados para o crescimento celular, possuem substâncias essenciais para as atividades vitais das células, seu amadurecimento e replicação. Em geral, tais meios contêm minerais, tampões, vitaminas, antibióticos, glicose, hormônios, fatores de adesão e soro como uma fonte de fator de crescimento, além de proporcionar condições desejáveis de pH e de osmolaridade. Usualmente, as células Caco-2 são cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) que apresenta altas concentrações de aminoácidos, equiparando-se às concentrações proteicas das células de humanos saudáveis. O meio possui elevada concentração de glicose (4,5g/L), sendo complementado com 1% de glutamina 200mM, 10% de soro fetal bovino e 1% de aminoácidos não essenciais. Durante a manutenção das culturas deve-se adicionar o meio adequado, em temperatura de 37° C e as células podem ser conservadas em garrafas de cultura e atmosfera composta por ar atmosférico, umidade relativa e 5% de CO<sub>2</sub>. Normalmente utiliza-se também, penicilina (100 UI/ml) e/ou estreptomicina (100µg/ml) para evitar riscos de contaminação microbiana (BURGENER; BUTLER, 2006; ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001; BEHRENS; KISSEL, 2003; BAILEY; BRYLA; MALICK, 1996).

Durante o cultivo das células devem ser evitadas variações do pH do meio de cultivo, devido a isto, acrescenta-se estabilizantes de pH, como por exemplo, bicarbonato de sódio ou ácido etanossulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1 (HEPES) que consiste em uma solução tampão (BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996).

Durante o período de subcultivo ainda na garrafa de cultura, as células estarão fixas na parede do recipiente. Dessa forma o meio deverá ser aspirado com cautela para que não ocorra o descolamento da célula que se encontra aderida à parede da garrafa. Para realizar este procedimento adiciona-se a enzima tripsina em uma concentração de 0,25% e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 1mM. A tripsina tem ação a uma temperatura de 37°C por um período 5 minutos. O procedimento de tripsinização é feito para facilitar o isolamento das células aderidas à parede do frasco, pois é formada uma película de líquido sobre a camada de células que irá auxiliar na remoção das mesmas após descolamento da parede da garrafa. O volume de DMEM empregado para ressuspender as células Caco-2 é estimado por meio da quantidade de membranas ou porções contendo as células (quantidade de réplicas ou poços na placa) que se deseja obter (LEA, 2015; BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996).

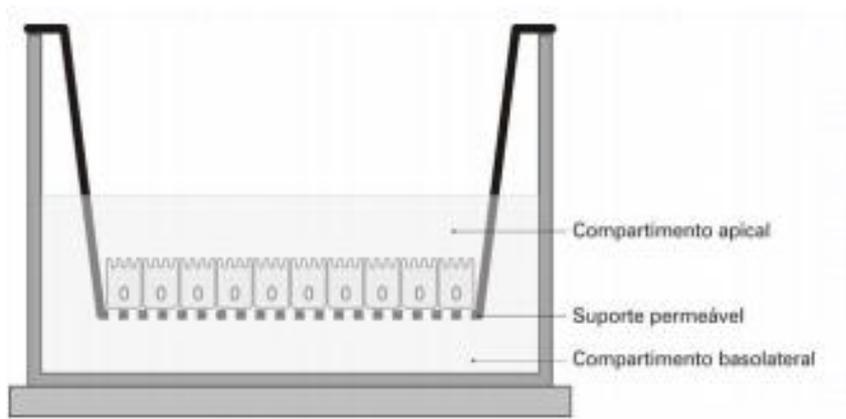
Para a condução dos experimentos de permeabilidade as células são transferidas para placas com suporte adequado para que se depositem e ao replicar formem uma membrana. Para que as células da membrana atinjam pelo menos, 80% de confluência são necessários aproximadamente três a cinco dias de repique ou subcultivo. Embora, ao todo, são necessários em torno de 21 dias para a preparação das membranas celulares em monocamadas com diferenciação adequada ao emprego em estudos de permeabilidade (STORPIRTIS, S. et al, 2009; BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996).

Os estudos de permeabilidade são realizados após as células serem colocadas em suportes porosos, contidos em microplacas (*Well plate*). Comercialmente, existem inúmeros suportes divergindo em tamanho e material. Embora os mais utilizados sejam compostos de polietileno, policarbonato, entre outros, variando, principalmente, no tamanho dos poros. Assim, as placas podem conter de 6 a 96 poços e os suportes podem ter poros

que variam de 0,4 e 12  $\mu\text{m}$ . (BAILEY; BRYLA; MALICK, 1996; BEHRENS; KISSEL, 2003; STORPIRTIS et al, 2009).

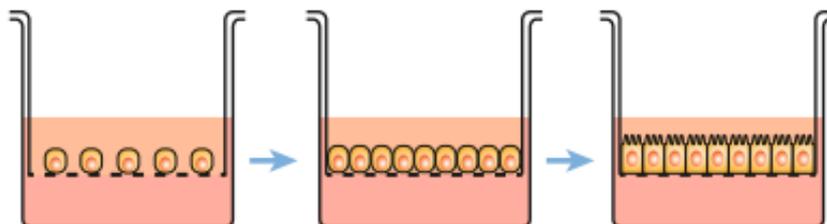
O cultivo das células nos poços é realizado com meio DMEM suplementado que deve ser trocado a cada 48 horas. As células devem ser banhadas em ambos os lados da membrana, ou seja, tanto na porção apical (parte superior) quanto na porção basolateral (parte inferior), atingindo-se confluência no período de seis a dez dias (Figura 1). (BEHRENS; KISSEL, 2003; BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996).

Figura 1: Representação do suporte para o cultivo de células Caco-2 visando os experimentos de permeabilidade. As porções apical e basolateral devem permanecer totalmente imersas no meio de cultivo. Fonte: Ciências Farmacêuticas – biofarmacotécnica (STORPIRTIS et al., 2009).



Posteriormente, as células começam a demonstrar as características desejadas, processo denominado por diferenciação celular que ocorre em 21 dias, conforme apresentado na Figura 2. As células Caco-2, após a diferenciação, expressam morfologia celular contendo aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de altura, apresentam microvilosidades, formação de complexo juncional e expressão de transportadores ativos na membrana, características funcionais similares às dos enterócitos (BEHRENS; KISSEL, 2003; LEA, 2015).

Figura 2: Processo de diferenciação da célula Caco-2 no suporte após o período de cultivo de 21 dias. É possível observar o aparecimento de microvilosidades após 21 dias de cultivo Fonte: The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health – The Caco-2 Cell line (LEA , 2015).



A avaliação da confluência e da integridade da membrana é realizada por meio da leitura da resistência elétrica transepitelial (RET) e está intimamente relacionada com o complexo de junções intercelulares (junções oclusivas, junções intermediárias e desmossomas). As junções oclusivas impedem a difusão lateral de moléculas e também são responsáveis pela resistência elétrica medida entre os lados basolateral e apical da membrana (BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996; TANAKA Y et al., 1995; PRESS, DI GRANDI, 2008).

Devido a formação de membranas íntegras que são caracterizadas por junções oclusivas pode-se determinar a permeabilidade da substância em análise, visto que, as junções dificultam a troca de eletrólitos. A falta das junções ou sua má formação permitirá o transporte de íons e moléculas pelos espaços intercelulares, diminuindo os valores da resistência transepitelial. No entanto, o aumento dos constituintes especialmente de origem proteica, responsáveis por formar o complexo juncional, eleva consideravelmente os valores da RET (PRESS, DI GRANDI, 2008).

Para determinar os valores da RET deve-se imergir um voltímetro interligado com minieletrodos, ao mesmo tempo, na porção apical e basolateral, antes e depois da realização dos experimentos. Assim, é possível fazer a medição da resistência elétrica em ohms ( $\Omega$ ) fornecida pelos eletrodos. Para a leitura correta do resultado, é necessário multiplicar o valor da leitura decorrente da RET pelo valor da área do suporte utilizado no subcultivo ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ). Dessa forma, a partir dos valores obtidos é possível identificar a

integridade da membrana e também qualificar a formação das junções intercelulares (BEHRENS; KISSEL, 2003; BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996; DELIE; RUBAS, 1997).

A integridade da célula Caco-2 pode também ser detectada por meio da avaliação da permeabilidade de compostos marcadores da difusão paracelular. Essas substâncias marcadoras devem apresentar baixos valores para coeficiente de permeabilidade. Destacam-se entre eles o polietilenoglicol, o manitol e a dextrana conjugada ao isotiocianato de fluoresceína. As características físico-químicas do manitol o tornam um bom marcador de permeabilidade, visto que, apresenta massa molar de 182g/mol, raio de 41 nm, é hidrossolúvel, pouco permeável através das membranas, não ionizável e com taxa metabólica desprezível. Alguns compostos utilizados para detectar a integridade da membrana podem ser marcados radioativamente. Assim, eles serão quantificáveis por cintilografia, favorecendo o seu emprego nos experimentos de permeabilidade (BAILEY; BRYLA; MALICK, 1996; STORPIRTIS et al, 2009).

Para a avaliação da permeabilidade dos fármacos é necessário que as células tenham atingido a confluência total e já se encontrem na sua forma diferenciada. Além disso, para a condução dos testes de permeação, deve-se escolher o sentido da permeação podendo ser apical para o basolateral, simulando a absorção do lúmen intestinal para a circulação sanguínea ou no sentido oposto (basolateral-apical), reproduzindo a saída do composto, a partir da corrente sanguínea para o interior do lúmen intestinal. Por exemplo, a ranitidina é um fármaco antagonista do receptor  $H_2$  utilizado no tratamento de úlceras gástricas e duodenais. Porém, estudos sugerem que parte do transporte da ranitidina seja afetada pelos transportadores de efluxo. Tais transportadores expõem a droga para dentro do lúmen intestinal, o que implica na diminuição da absorção do fármaco, ocasionando na sua baixa biodisponibilidade ((STORPIRTIS et al, 2009; ASHIRU-OREDOPE et al., 2011; LEE et al., 2002).

## 2.2. Estudos de permeabilidade utilizando Células Caco-2

As células Caco-2 têm sido utilizadas para estudar o transporte de fármacos por uma ou mais rotas simulando as membranas do epitélio intestinal. Entre as rotas que possibilitam a permeação de fármacos e substâncias bioativas, temos as seguintes formas de transporte: mediado por carreadores, passivo transcelular, passivo paracelular e por transcitose (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012)

A solução adicionada ao meio de permeabilidade nos compartimentos apical e basolateral é formulada de modo a garantir maior proximidade com as propriedades do trato gastrointestinal *in vivo*. No compartimento apical, para a nutrição e manutenção da célula é adicionada a solução salina de Hanks balanceada contendo glicose 10 mM e, podendo ser complementada com soro fetal bovino, variando nas proporções de 0,5 e 2%. O pH do meio deve ser próximo ao pH detectado em condições fisiológicas, variando entre 5,5 e 7,4. Utiliza-se o estabilizador de pH MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado) 10 mM para valores de 5,5 e 6,5. Já em condições em que o pH se encontra entre 6,5 e 7,4 utiliza-se HEPES a 10 mM. Para o compartimento basolateral o valor mantém-se fixo, igualando ao pH do sangue, próximo a 7,4 (BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996).

Para o início do experimento de permeabilidade é necessário a retirada do meio de cultivo, seguida de lavagem da membrana com a solução salina de Hanks. Posteriormente, para avaliar a integridade da membrana, deve-se acrescentar o meio de cultivo de permeabilidade e então determinar o valor de RET. Em seguida, incorpora-se o fármaco solubilizado nos meios em que serão adicionados aos compartimentos, no sentido em que se deseja avaliar, seja no sentido apical → basolateral ou basolateral → apical (YOUDIM et al., 2003; BAILEY; BRYLA; MALICK , 1996; STORPIRTIS, S. et al, 2009).

Após a adição do meio à membrana celular em uma temperatura de 37°C e sob constante agitação para impedir a produção de uma película de líquido imóvel em contato com a superfície da célula, inicia-se os experimentos de permeabilidade. Em tempos previamente estabelecidos, realiza-se a amostragem do meio basolateral, quando a permeação é avaliada no sentido apical-basolateral ou no compartimento apical, quando o processo é analisado

no sentido basolateral-apical. Posteriormente a cada coleta, deve-se fazer a reposição do meio isento do fármaco para manter o volume constante durante todo o procedimento (STORPIRTIS et al., 2009).

Para finalizar o ensaio, devem-se retirar os resquícios do meio de permeabilidade, lavar a membrana e adicionar meio fresco nos dois lados. Posteriormente, é determinado o valor de RET para garantir que a membrana permaneceu íntegra ao longo de todo o experimento. (STORPIRTIS et al., 2009).

A fim de quantificar ou determinar a quantidade de fármaco retida no interior da membrana deve-se lisar a membrana e extrair a substância presente em seu interior empregando solvente orgânico, tais como, metanol e acetonitrila (STORPIRTIS et al., 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar revisão narrativa visando descrever as condições para realização do estudo de permeabilidade de fármacos por ensaios *in vitro* utilizando Caco-2.

#### **3.2 Objetivos específicos**

I Fazer levantamento bibliográfico sobre as condições para o cultivo das células Caco-2 utilizadas para o estudo de permeabilidade.

II Avaliar a utilização de membranas com Caco-2 para o cálculo da permeabilidade aparente e análise da permeabilidade intestinal de fármacos.

## 4. MÉTODO

### 4.1 Levantamento bibliográfico sobre as condições de cultivo das células Caco-2 utilizadas para o estudo de permeabilidade.

O levantamento bibliográfico foi realizado em livros didáticos de farmacologia e farmacotécnica e também nas seguintes bases de dados *on line*: periódicos CAPES, PUBMED, SCIELO, onde utilizou-se como descritores os seguintes termos: Caco-2, permeabilidade e cultivo celular.

A busca foi feita com base em artigos, teses e dissertações. As principais informações levadas em consideração foram: Caco-2, cultivo celular, ensaios *in vitro* e permeabilidade de fármacos, bem como, resultados e aplicações deste modelo *in vitro* para avaliação da permeabilidade de fármacos.

Realizou-se também o cruzamento de descritores como Permeabilidade e Caco-2 (permeability and caco-2), Caco-2 e cultivo celular (Caco-2 and cell culture) permeabilidade intestinal e Caco-2 (Caco-2 and, intestinal permeability), células de adenocarcinoma humano (human colon adenocarcinoma cells). A busca incluiu também os idiomas inglês e português.

Os critérios de inclusão foram artigos contendo informações sobre as células Caco-2, permeabilidade intestinal, por exemplo, como calcular resultados de permeabilidade empregando membranas com células Caco-2, condições para formação de membrana e cultivo celular de Caco-2 (meios de cultura, agentes antimicrobianos, adição de suplementos e vitaminas, tempo e temperatura de cultivo). Nesta seção não levou-se em consideração a data de publicação dos estudos.

## **4.2 Utilização de membranas formadas por células Caco-2 para o cálculo da permeabilidade aparente e análise da permeabilidade de fármacos.**

Para obtenção dos resultados selecionou-se aqueles artigos em que apresentaram experimentos de permeabilidade com fármacos utilizando as células Caco-2. Dentre os artigos selecionados a partir da busca conforme descrito no item anterior (4.1) analisou-se aqueles que continham informações de como realizar realização dos ensaios de permeabilidade, quantidades de amostras necessárias, fórmula para cálculo da amostra, volume e forma de amostragem dos meios utilizados nos experimentos. Priorizou-se também estudos que continham as equações para cálculos de permeabilidade aparente, e também artigos contendo exemplos dos experimentos e informações sobre os cálculos necessários para determinar a permeabilidade.

Nesta seção o tempo de publicação foi levado em consideração. Onde excluiu-se artigos experimentais e de revisão publicados fora do período de doze anos. Também se excluiu resumos e editais.

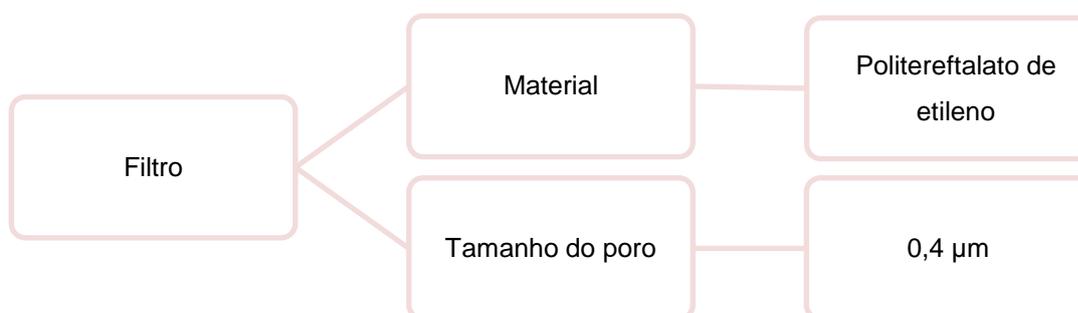
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Levantamento bibliográfico sobre os métodos de cultivo das células Caco-2 utilizadas para o estudo de permeabilidade.

Com base nos artigos consultados verificou-se que para realizar o experimento de permeabilidade empregando células Caco-2 é necessário adquirir as células com o código fornecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC) definido ou células padronizadas para experimentos. Então deve-se ativar as células congeladas e realizar o repique ou passagens visando torná-las adequadas ao experimento. Os artigos relatam de 28 a 65 passagens como ideais (BRISKE-ANDERSON et al., 1997).

Para Behrens e Kissel (2003) após a revitalização as células são semeadas em placas de forma que a densidade atingida deve ser em torno de  $6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>; As células são cultivadas em suportes de filtros permeáveis, que permitem o livre acesso de íons e nutrientes, onde estas devem ter suas porções apicais e basolaterais totalmente imersas no líquido. As placas utilizadas podem ser de diferentes materiais, tamanhos e número de poços. Estudos realizados por Delie e Rubas (1997) indicaram que o material mais adequado para o filtro é o politereftalato de etileno (PET). O filtro de PET possui propriedades inertes e baixa ligação a proteínas. O tamanho dos poros varia entre 0,4 e 8 µm, sendo que o tamanho mais adequado para os estudos de transporte são de 0,4 µm. Tamanhos maiores são mais recomendados para os estudos das interações entre as células, como em estudos utilizando coculturas (LEA, 2015; BEHRENS; KISSEL, 2003; DELIE; RUBAS, 1997).

Figura 3: Organograma contendo as informações mais encontradas na literatura sobre o suporte de filtro. Referência: DELIE; RUBAS, 1997; LEA, 2015 Fonte: Figura elaborada pelo autor.

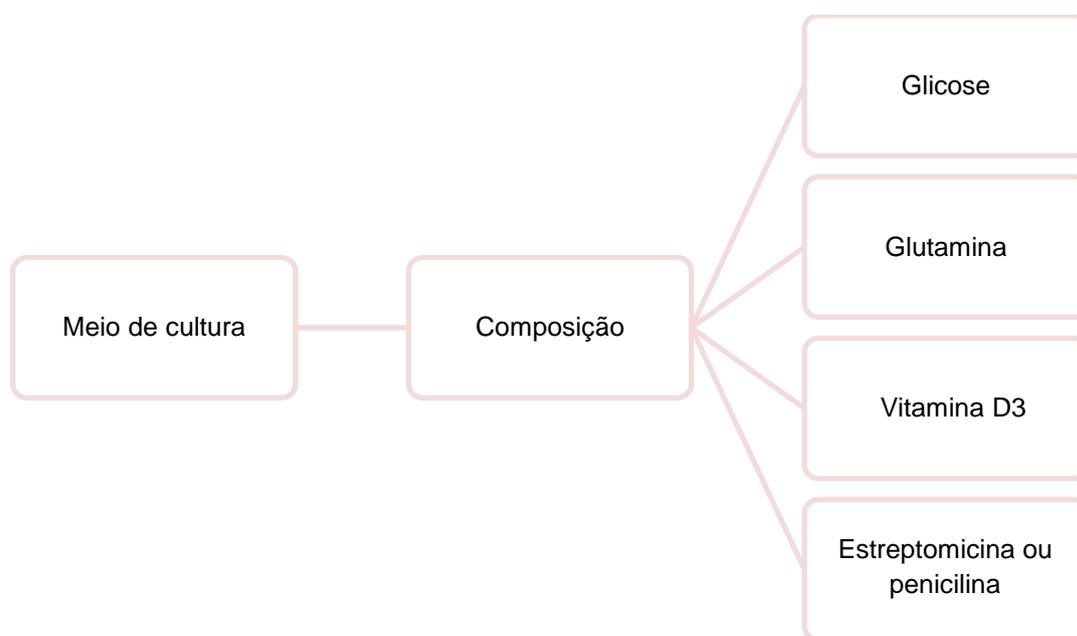


A característica da célula deve ser levada em consideração, visto que quantidades satisfatórias de nutrientes no meio são consideradas relevantes para que as células cresçam de maneira apropriada. Dessa forma, alguns tipos de células requerem elevada quantidade de nutrientes conforme sua atividade metabólica e velocidade de proliferação quando comparadas a outros tipos. Por exemplo, células que possuem altas taxas metabólicas devem ter esta informação levada em consideração durante a seleção do meio mais adequado para o seu cultivo (D'SOUZA et al., 2003).

Segundo Yao e Asayama (2017), o meio DMEM, por exemplo, foi projetado originalmente para conter glicose em uma concentração de 5,6 mmol/L. Atualmente em uma versão modificada é possível encontrar meio DMEM contendo concentração de glicose de 25 mmol/L, possibilitando seu uso para células que requerem maiores quantidades de glicose. No entanto, para D'Souza e colaboradores (2003), elevadas concentrações de glicose alteram as propriedades de barreira da membrana formada por Caco-2, dificultando o transporte dos solutos. Dessa forma, a concentração de glicose igual a encontrada em condições fisiológicas é mais adequada quando comparada com o meio contendo altas concentrações. Diante da importância do meio para o cultivo celular e crescimento adequado da célula, alguns estudos indicaram

também suplementações nos meios em que há presença de outros nutrientes como baixas concentrações de glutamina (0,2 mmol/L) e vitamina D3. Adiciona-se também antibióticos como penicilina ou estreptomicina a fim de evitar contaminação do meio, conforme exposto na figura 4 onde ressaltam-se as principais substâncias que devem estar contidas no meio.(D´SOUZA et al., 2003; FISHER et al., 1999; DEMARCO et al., 2003; YAO; ASAYAMA, 2017; STORPIRTIS et al., 2009).

Figura 4: Organograma evidenciando a composição do meio DMEM mais comumente encontrada. Referência: DEMARCO et al, 2003, FISHER et al, 1999, D' SOUZA et al., 2003. Fonte: Organograma elaborado pelo autor.



Quanto ao tempo de cultivo, grande parte dos autores indicaram que o período ideal seja de aproximadamente 21 dias ou 3 semanas. Diversos pesquisadores como Lentz e colaboradores (2000) e Chong (1997), realizaram estudos visando diminuir este tempo entre semear as células nas placas e a realização dos experimentos. Neste contexto Chong (1997) apresenta o sistema *Biocoat® Intestinal Epithelium Differentiation Environment* (BIEDE) que

consiste em alterar as condições de cultivo visando obter a diferenciação celular em tempo muito inferior quando comparado com a cultura celular convencional. A diferença entre a cultura celular convencional e a cultura com a diferenciação em tempo reduzido, é que na primeira, a diferenciação celular é alcançada após 2 a 3 semanas, e na segunda esta diferenciação ocorre em apenas 3 dias. Assim, os sistemas que visam obter a diferenciação celular mais rapidamente possibilitam a redução dos índices de contaminação, já que o elevado tempo de cultura possibilita o aparecimento de impurezas que podem levar a contaminação do meio de cultura (CHONG,1997).

O sistema BIEDE distingue-se do sistema de cultivo convencional em alguns fatores, são eles; material do suporte da membrana de filtro, onde utiliza-se a membrana filtrante de PET em detrimento do uso do suporte de Policarbonato; tipo de proteína de matriz extracelular que tem como função facilitar a adesão celular, em que emprega-se o colágeno de cauda de rato para substituir o colágeno fibrilar e também na constituição do meio de cultura, em que utiliza-se o meio DMEM contendo ácido butírico e não soro fetal bovino. (CHONG, 1997)

Ainda nesse contexto, a fim de reduzir o tempo de cultivo para 4 dias, Lentz e colaboradores desenvolveram um novo método de cultivo em que altera-se a composição do meio para cultivo de células Caco-2 visando obter as monocamadas utilizando soro de vitelo suplementado com ferro e fatores de crescimento em concentração de 2% em detrimento de 10% de soro fetal bovino. Os resultados de permeabilidade utilizando compostos marcadores de alta e baixa permeabilidade como metropolol e manitol proporcionaram resultados compatíveis com a literatura e comparáveis em relação aqueles obtidos com as condições de cultivo convencional (LENTZ et al., 2000).

Liang e colaboradores defendem a importância do modelo de cultura em tempo reduzido embora, também ressaltaram que o sistema BIEDE pode não ser tão eficiente para compostos hidrofílicos, visto que os valores de permeabilidade aparente encontrados são muito discrepantes quando comparados com o modelo tradicional (LIANG et al., 2000).

Ainda nesse contexto, para os resultados de permeabilidade aparente encontrados no modelo acelerado ao testar diferentes compostos marcadores de alta e baixa permeabilidade, percebeu-se que os resultados de

permeabilidade aparente foram superiores no modelo acelerado para fármacos com características hidrofílicas.

A permeação destas substâncias hidrofílicas depende principalmente da rota paracelular e a permeação de compostos lipofílicos dependem de vias paracelular e transcelular para permeação. Porém é importante ressaltar que apesar dessa pequena diferença, o modelo acelerado apresentou uma boa correlação entre os coeficientes de permeabilidade com o modelo convencional, podendo ser utilizado principalmente para facilitar a triagem de grande quantidade de compostos, onde se deseja obter uma rápida determinação do coeficiente de permeabilidade aparente (LIANG et al., 2000).

## **5.2 Análise da permeabilidade de fármacos utilizando membranas formadas por células Caco-2.**

Visando obter artigos que determinaram a permeabilidade de fármacos utilizando membranas Caco-2 e analisar como esta determinação foi feita aplicou-se os critérios utilizados para a seleção dos artigos. Os resultados foram extraídos a partir da investigação das informações dos cálculos de preparo de amostra, de permeabilidade, quais as substâncias empregadas como controle de alta e baixa permeabilidade, quais os parâmetros necessários para aplicação do procedimento (polarização da membrana, diferenciação celular e RET). Estas informações possibilitaram mostrar os resultados de permeabilidade obtidos e sua forma de interpretação, gerando assim material bibliográfico que auxilie pesquisadores a aplicar este modelo experimental.

Para realizar os experimentos de permeabilidade aparente, deve-se atentar ao pH do meio. É importante ressaltar que o pH do meio além de influenciar no crescimento das células também interfere nos estudos de permeabilidade. Segundo Volpe (2008), este deve estar de acordo com a solubilidade das substâncias em análises. Neste sentido durante os experimentos, o pH dos compartimentos doador e receptor podem ser iguais (chamados experimentos isocráticos) ou diferentes (experimentos com gradiente). Dessa forma, substâncias ácidas, geralmente tem resultado de permeabilidade aparente maior em experimentos gradiente, por exemplo, utilizando pH 6,5 no compartimento doador e 7,4 no compartimento receptor. Por outro lado, o transporte de substâncias básicas é facilitado na presença de situações isocráticas, em que o pH permanece igual em ambos os compartimentos (7,4) (VOLPE, 2008).

Além de auxiliar na investigação da permeabilidade, as monocamadas de células Caco-2 são utilizadas para avaliar a captação e o transporte do fármaco. Outros autores desafiaram os métodos em diferentes condições para determinar se a permeabilidade é alterada, como por exemplo, diferentes concentrações do analito e também na presença e ausência de substâncias associadas ao fármaco em estudo.

Na Tabela 1 é possível observar que para diversos objetivos propostos pelos autores os cálculos se tornam fundamentais para realizar a análise da permeabilidade dos compostos em estudo. Em geral, para as células Caco-2 a fórmula de permeabilidade aparente é a mais utilizada para avaliar a permeabilidade dos fármacos. A permeabilidade aparente pode ser definida pela determinação da passagem do composto através da membrana de um compartimento doador para o compartimento receptor em função do tempo. Ou seja, o quanto aquele composto foi capaz de permear a membrana. Assim, a permeabilidade aparente de fármacos é calculada ao traçar as concentrações quantificadas das amostras presentes no compartimento receptor versus o tempo de amostragem, gerando uma curva de concentração X tempo e sua respectiva inclinação (STORPIRTIS, S. et al, 2009, PALUMBO, et al, 2008).

Volpe (2008) propõe a utilização da fórmula que consiste na divisão do volume do meio no compartimento receptor dividido pela concentração do fármaco em análise no compartimento doador em relação ao tempo de amostragem. A fórmula está representada na Equação 1.

Equação 1: Fórmula matemática proposta por Volpe (2008) para realizar o cálculo de permeabilidade aparente utilizando as monocamadas de células Caco-2.

Equação 1:

$$P_{app} = \frac{VR}{A \times C_0} \times \frac{dC}{dt}$$

Onde: VR representa o volume na câmara receptora, A representa a área de superfície do filtro,  $C_0$  é a concentração inicial na câmara doadora e  $dC/dt$  consiste na derivada da concentração versus o tempo (VOLPE, 2008).

Os autores apresentaram alternativas matemáticas para as equações do cálculo de  $P_{app}$ . Como podemos observar na Tabela 1 as equações podem ser escritas de outras formas para a mesma finalidade, como por exemplo, conforme descrito na Equação 2. Em que  $dQ/dt$  representa o fluxo através da

monocamada, A corresponde a área da superfície da membrana e  $C_0$  é a concentração no compartimento doador (ASHIRU-OREDOPE et al., 2011).

Equação 2: Fórmula matemática proposta por Ashiru-Oredope (2011) para realizar o cálculo de permeabilidade aparente utilizando as monocamadas de células Caco-2.

Equação 2:

$$P_{app} = \left( \frac{1}{AC_0} \right) \left( \frac{dQ}{dt} \right)$$

A velocidade de efluxo é estabelecida pelo quociente entre os resultados de  $P_{app}$  calculados na direção basolateral para apical (BL→AP) divididos pelo resultado obtido na direção apical para basolateral (AP→BL). Velocidade de efluxo maior que 1,0 sugere predominância no transporte secretório indicando a presença de transporte de efluxo (ASHIRU-OREDOPE et al, 2011). ZHU e LIANG (2013) utilizaram em seus estudos a razão entre os resultados de permeabilidade aparente nos sentidos basolateral (BL) – apical (AP) e apical (AP) -basolateral (BL) ou *Apparent Permeability Ratio* (PDR) conforme apresentado na Equação 3.

Equação 3: Fórmula matemática proposta por Liang (2013) para realizar o cálculo de razão de permeabilidade aparente utilizando as monocamadas de células Caco-2. Esta equação indica o mecanismo de transporte da substância.

Equação 3

$$PDR = \frac{P_{app_{BL-AP}}}{P_{app_{AP-BL}}}$$

A fórmula de PDR correlaciona-se com a equação de *Papp*, pois através dela é possível determinar qual o mecanismo predomina no transporte do fármaco em estudo. Assim sendo, tem-se que os valores de PDR abaixo de 1,5 tendem a indicar que o principal mecanismo de transporte ocorre por difusão passiva. Portanto, os valores de PDR acima de 1,5 correspondem ao transporte mediado por proteínas de efluxo, ou seja, quando a entrada do fármaco na célula (absorção) é prejudicada por transportadores específicos de efluxo, como, por exemplo, glicoproteína P (Pgp) (ZHU et al, 2013).

Na Tabela 1 estão apresentadas informações sobre pesquisas realizadas com 10 analitos empregando membranas compostas por células Caco-2. Os experimentos foram conduzidos objetivando responder a distintas perguntas: Qual mecanismo de transporte é predominante? Existe influência de transportadores de efluxo e influxo? A associação de fármacos ou a adição de adjuvantes pode melhorar ou comprometer a absorção?

Nos trabalhos realizados por Ashiru-Oredope et al. (2011), Zhu et al. (2013), Roger et al. (2012) e Liang et al. (2012), foram adicionadas substâncias ao analito de interesse e a associação aumentou o transporte do analito no sentido absorptivo. Assim as substâncias utilizadas podem ser consideradas promotoras de absorção e o aumento do transporte no sentido AP → BL pode ser inerente a maior afinidade do promotor de absorção pelos transportadores de efluxo, deixando assim o analito livre para permear. O artigo publicado por Gonçalves et al. (2012) é utilizado como um exemplo onde as condições para o preparo das membranas mimetizam as condições *in vivo* e podem ser discutidas visando inferir sobre quais as condições mais adequadas para administrar um medicamento visando maior permeação/absorção do fármaco.

As pesquisas realizadas por Zhang et al. (2018), Jin et al., (2014) e Bonetti et al., (2018) se basearam em repetições dos experimentos visando elucidar o mecanismo que envolve a permeação. Os resultados possibilitaram afirmar em quais casos ocorre a predominância de transporte ativo ou passivo.

Huang et al (2010) e Souza et al (2009) avaliaram e discutiram em seus experimentos a influência da associação de fármacos ou a utilização de

carreadores na permeação dos analitos de interesse utilizando como modelo *in vitro* as membranas obtidas com células Caco-2.

Os trabalhos citados na Tabela 1 representam a diversidade de aplicações que o modelo de permeabilidade *in vitro* utilizando células Caco-2 pode proporcionar. Alterações na condução dos experimentos possibilitam responder a distintas hipóteses para as pesquisas desenvolvidas. Assim este trabalho de conclusão de curso contribui para reunir as diversas condições experimentais descritas na literatura durante o período proposto e discuti-las proporcionando proveitoso material de consulta sobre o tema.

Tabela 1: Resumo de informações referentes a estudos de permeabilidade de fármacos empregando células Caco-2, contendo objetivo, equação para cálculo da permeabilidade, mecanismo de transporte e breve resumo das conclusões obtidas. (continua)

Fármaco/analito	Objetivo	Como foi feito o cálculo	Permeabilidade	Conclusões	Referências
Ranitidina	Avaliar a permeabilidade da ranitidina de AP→ BL e de BL →AP na presença de PEG 300 e 400.	$P_{app}$ $\left(\frac{1}{AC_0}\right)\left(\frac{dQ}{dt}\right)$	Substrato para efluxo.	O PEG 400 em doses mais baixas melhora o transporte de ranitidina.	Ashiru-Oredope et al., 2011.
Baicalina	Aumentar a permeabilidade do flavononóide Baicalina através da associação das ervas <i>Radix Scutellariae</i> e <i>Radix Angelicae Dahuricae</i> .	$P_{app}$ $\frac{\Delta Q}{\Delta t \times A \times C_0}$ $PDR$ $\frac{P_{app_{BL-AP}}}{P_{app_{AP-BL}}}$	Difusão passiva de AP→ BL.	A erva <i>Radix Angelicae Dahuricae</i> aumentou significativamente o transporte de baicalina no sentido AP →BL.	Zhu et al., 2013.
Pueraria	Investigar o efeito da <i>Radix Angelicae Dahuricae</i> na absorção intestinal de pueraria.	$P_{app}$ $\frac{\Delta Q}{\Delta t \times A \times C_0}$ $PDR$ $\frac{P_{app_{BL-AP}}}{P_{app_{AP-BL}}}$	Substrato para efluxo	A erva <i>Radix Angelicae Dahuricae</i> inibe o a P-gp e o MRP aumentando a absorção	Liang et al., 2012.

Tabela 1: Resumo de informações referentes a estudos de permeabilidade de fármacos empregando células Caco-2, contendo objetivo, equação para cálculo da permeabilidade, mecanismo de transporte e breve resumo das conclusões obtidas. (continua)

Fármaco/Analito	Objetivo	Como foi feito o cálculo	Permeabilidade	Conclusões	Referências
Fucanas	Avaliar o mecanismo de transporte da fucana associada ao Isotiocianato de Fluoresceína por métodos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>Papp</i> $\left(\frac{1}{ACo}\right)\left(\frac{dQ}{dt}\right)$	Transporte ativo	Verificou-se que a absorção da fucana requer consumo de energia.	Zhang et al., 2018.
Primaquina e outros anti-maláricos	Avaliar a permeabilidade de fármacos antimaláricos e compreender a influência de transportadores na absorção e na distribuição.	<i>Papp</i> $\frac{Vr}{A \times Pi} \times \frac{Pr}{T}$	Transporte ativo	Uma boa ferramenta para o processo de desenvolvimento de medicamentos novos fármacos antimaláricos	Jin et al., 2014.
Nitrosóis	Esclarecer o mecanismo de transporte intestinal do S-nitrosotiol e do óxido nítrico	<i>Papp</i> $\left(\frac{1}{ACo}\right)\left(\frac{dQ}{dt}\right)$	Transporte passivo	Os compostos S-nitrosotóis podem ser administrados por via oral	Bonetti et al., 2018.
Paclitaxel	Avaliar o transportador de ácido fólico para melhorar o transporte do paclitaxel encapsulado em nanopartículas.	<i>Papp</i> $\left(\frac{1}{ACo}\right)\left(\frac{dQ}{dt}\right)$	Substrato para efluxo	A funcionalização do ácido fólico melhorou significativamente o transporte do paclitaxel.	Roger et al., 2012.

Tabela 1: Resumo de informações referentes a estudos de permeabilidade de fármacos empregando células Caco-2, contendo objetivo, equação para cálculo da permeabilidade, mecanismo de transporte e breve resumo das conclusões obtidas.

Fármaco/Analito	Objetivo	Como foi feito o cálculo	Permeabilidade	Conclusões	Referências
Insulina	Prever o comportamento e a eficiência da insulina carregada no copolímero Ag-g-HA.	<i>Papp</i> $\left(\frac{1}{A C_0}\right) \left(\frac{dQ}{dt}\right)$	Transporte Ativo	O Ag-g-HA como portador de insulina melhora significativamente promove a permeabilidade da insulina.	Huang et al. 2010.
Lamivudina e zidovudina	Avaliar o transporte de lamivudina e zidovudina em diferentes concentrações	<i>Papp</i> $\frac{\text{Taxa de transporte}}{A \times C_0}$	Substrato para efluxo	Embora sejam substratos para P-gp a quantidade de lamivudina utilizada não afeta a permeabilidade de zidovudina.	Souza et al., 2009.
Rifampicina	Avaliar a permeabilidade do fármaco diante dos efeitos do pH, da presença de mucina no compartimento apical e de albumina sérica bovina (ASB) no compartimento basolateral.	<i>Papp</i> $\frac{VR \times dQ}{dt} \frac{1}{(A \times C_0)}$	Substrato para efluxo	A rifampicina associada à mucina no compartimento apical e ASB na câmara basolateral e em diferentes condições de pH, aumentou a complexidade dos ensaios tornando-se dispensável.	Gonçalves et al., 2012.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram apresentadas e discutidas as distintas condições para o cultivo de células Caco-2 de modo a formar membranas em monocamada ideais e melhorar as condições para os estudos de permeabilidade. Dentre estas condições cabe ressaltar tipo de material do filtro de suporte para o subcultivo, quantidade de nutrientes e a faixa de pH ideal de acordo com a substância em análise.

Para o crescimento das células o suporte de filtro no material politereftalato de etileno é o mais indicado para o cultivo. Em relação à quantidade de nutrientes, percebe-se que as células possuem melhor crescimento e diferenciação quando os nutrientes são colocados respeitando as condições fisiológicas. Já para os estudos de permeabilidade, o pH ideal varia de acordo com a característica do fármaco. Os fármacos que possuem propriedades ácidas são favorecidos em situação gradiente sendo: pH 6,5 no compartimento apical e 7,4 no compartimento basolateral e fármacos com características básicas comportam-se melhor quando se encontram em condições isocráticas, com pH 7,4 em ambos os compartimentos.

Apresentou-se também, diversas utilizações das membranas formadas por Caco-2 para determinação da permeabilidade intestinal de fármacos. Para os cálculos de permeabilidade aparente foram empregadas distintas conformações e símbolos para o fenômeno representado matematicamente por equações que proporcionam o mesmo resultado.

Os estudos de permeabilidade utilizando células Caco-2 também permitem determinar o mecanismo de transporte de cada substância em estudo.

É importante ressaltar que as monocamadas de células Caco-2 tem como desvantagem a variabilidade no método de cultivo entre diversos laboratórios, fazendo com que a padronização da técnica torne-se indispensável para obtenção de resultados reprodutíveis.

## 7. REFERÊNCIAS

ARTURSSON Per, PALM, Katrin, LUTHMAN Kristina, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.22, p.27-43, set. 2001.

ARTURSSON, Per; PALM, Katrin; LUTHMAN, Kristina. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Suécia, ed. 64, p. 280-289, dez. 2012.

ARTURSSON, Per; KARLSSON, Joakim. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v. 175, p. 880-5, 1991

ASHIRU-OREDOPE, Diane A.I; PATEL, Nilesh; FORBES, Ben; PATEL, Rajesh; BASIT, Abdul W. The effect of polyoxyethylene polymers on the transport of ranitidine in Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, v. 409, p. 164-168, 4 mar. 2011.

BAILEY, Carole A.; BRYLA, Piotr; MALICK , A. Waseem. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. **Advanced Drug Delivery**, United States, ed. 22, p. 85-103, 1996.

BALIMANE, Praveen V; CHONG, Saeho; MORRISON, Richard A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, United States, v. 44, p. 301-312, 25 set. 2000.

BEHRENS, Isabel. KISSEL, Thomas. Do cell culture conditions influence the carrier mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V.10, p. 433–442, 2003.

BONETTI, Justine; ZHOU, Yi; PARENT, Marianne; CLAROT, Igor; YU, Haiyan; FRIES-RAETH, Isabelle; LEROY, Pierre; LARTAUD, Isabelle; GAUCHER, Caroline. Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, France, v. 155, p. 21-31, 21 jun. 2018.

BRISKE-ANDERSON, Mary J; FINLEY, John W; NEWMAN, Samuel M. The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological and Physiological Development of Caco-2 cells. **Experimental Biology and Medicine**, United States, p. 248-257, 1 mar. 1997.

BURGENER, A., BUTLER, M. "Medium Development". In: In: Ozturk, S.S., Hu, W., (Eds) **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and cell-based Therapies**, capítulo 3, New York, 2006.

CHONG, Saeho; DANDO, Sandra A; MORRISON, Richard A. Evaluation of Biocoat Intestinal Epithelium Differentiation Environment (3-day Cultured Caco-2 Cells) as an Absorption Screening Model With Improved Productivity. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1835-1837, 1 dez. 1997.

D'SOUZA, Vanessa M; SHERTZER, Howard G; MENON, Anil G; PAULETTI, Giovanni M. High Glucose Concentration in Isotonic Media Alters Caco-2 Cell Permeability. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Ohio, v. 5, ed. 3, p. 1-9, 2003.

DELIE F, RUBAS W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**. United States, v. 14, ed. 3, p. 221-286, 1997.

DEMARCO, Vincent G.; LI, Nan; THOMAS, Justin; WEST, Cristopher M; NEU, Josef Glutamine and Barrier Function in Cultured Caco-2 Epithelial Cell Monolayers **The Journal of Nutrition**, Gainesville, FL, v. 133, n. 7, p. 2176–2179, 1 jul. 2003

DEZANI, André Bersani. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos ex vivo (células de Franz) e in vitro (PAMPA) / Evaluation of mechanisms involved in the permeability of antiretroviral drugs through ex vivo (Franz cells) and in vitro (PAMPA) models**. Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra. 2017. 407 p. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2017.

FISHER, Jeannine M.; WRIGHTON, Steven A.; WATKINS, Paul B.; SCHMIEDLIN-REN, Phyllissa; CALAMIA, Justina C.; SHEN, Danny D.; KUNZE, Kent L.; THUMMEL, Kenneth E. First-Pass Midazolam Metabolism Catalyzed by 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub>-Modified Caco-2 Cell Monolayers. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, United States, v. 289, ed. 2, p. 1134–1142, 1999.

GONÇALVES JE, BALLERINI Fernandes M, CHIANN C, GAI MN, DE SOUZA J, STORPIRTIS S. Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. **Biopharm Drug Dispos**, Brasil, v. 33 ed.6, p. 316-323, 30 ago 2009

GINSKI, J.Mark., POLLI, James E. Prediction of dissolution absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. **Int. J. Pharm.**, v. 177, p. 117-125, 1999.

HUANG, JianYan; ZHANG, Lingmin; CHEN, Peng; CHEN, Shitao; WU, Yueheng; TANG, ShunQing. Transportation efficiency of insulin loaded in agarose-grafting-hyaluronan microparticle crossing Caco-2 cell monolayer. **Current Applied Physics**, China, v. 11, p. 794-799, 4 dez. 2010.

JIN, Xiannu *et al.* Comparison of MDCK-MDR1 and Caco-2 cell based permeability assays for anti-malarial drug screening and drug investigations. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, United States, v. 70, p. 188-194, 20 ago. 2014

LEA. T. Epithelial Cell Models; General Introduction in **The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: In Vitro and Ex Vivo Models**. [S. l.]: Springer Open, 2015.

LEE, Kiho; NG, Chee; BROUWER, Kim L. R; THAKKER, Dhiren R. Secretory Transport of Ranitidine and Famotidine across Caco-2 Cell Monolayers. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, United States, v. 303, n. 2, p. 574-580, 8 jul. 2002.

LENTZ, Kimberley A; HAYASHI, Jun; LUCISANO, Leo J; POLLI, James E. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system. **International Journal of Pharmaceutics**, United States, v. 200, p. 41-51, 25 abr. 2000.

LIANG, Earvin; CHESSIC, Kelli; YAZDANIAN, Mehran. Evaluation of an Accelerated Caco-2 Cell Permeability Model. **Journal of pharmaceutical sciences**, Connecticut, v. 89, ed. 3, p. 336-345, 3 mar. 2000.

LIANG, Xin-Li; ZHAO, Li-Jun; LIAO, Zheng-Gen; ZHAO, Guo-Wei; ZHANG, Jing; CHAO, Yun-Chao; YANG, Ming; YIN, Rong-Li. Transport Properties of Puerarin and Effect of Radix Angelicae Dahuricae Extract on the Transport of Puerarin in Caco-2 Cell Model. **Elsevier Ireland Ltd**, China, v. 150, p. 553-559, 25 set. 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger – **Principles of Biochemistry**, 4 ed, 2006.

PALUMBO, Pasquale; PICCHINI, Umberto; BECK, Benoît; GELDER, Jan van; DELBAR, Nathalie; DEGAETANO, Andrea. A general approach to the apparent permeability index. **Journal of Pharmacokinetic Pharmacodynamics**, Itália, v. 35, p. 235–248, 20 mar. 2008.

PRESS, B., GRANDI, DI. “Permeability for Intestinal Absorption: Caco-2 Assay and Related Issues”, **Current Drug Metabolism**. 2008

ROGER, Emilie; KALSCHEUER, Stephen; KIRTANE, Ameya; GURU, Bharath Raja; GRILL, Alex E; WHITTUM-HUDSON, Judith; PANYAM, Jayanth. Folic Acid Functionalized Nanoparticles for Enhanced Oral Drug Delivery. **Molecular Pharmaceutical**, United States, v. 9, p. 2103-2110, 6 jun. 2012.

SOUZA, Jacqueline de; BENET, Leslie Z; HUANG, Yong; STORPIRTIS, Sílvia. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, Brasil, v. 98, n. 11, p. 4413-4419, 1 nov. 2009.

SOUZA, Jacqueline de; FREITAS, Zaida Maria F.; STORPIRTIS, Sílvia. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 515-527, Dec. 2007.

STORPIRTIS, Silvia et al. Biofarmacotécnica - **Ciências Farmacêuticas**. EDITORA GUANABARA KOOGAN S.A., 2009.

TANAKA, Y. et al. Characterization of Drug Transport Through Tight-Junctional Pathway in Caco-2 Monolayer: Comparison with Isolated Rat Jejunum and Colon, **Pharmaceutical Research**, V.12, p. 523–528, 1995.

VOLPE, Donna A. Variability in Caco-2 and MDCK Cell-Based Intestinal Permeability Assays. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Maryland, v. 97, ed. 2, Fev. 2008.

YAMASHITA S. et al. Optimized Conditions for Prediction of Intestinal Drug Permeability Using Caco-2 Cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.10, 195-204, 2000.

YAO, Tatsuma; ASAYAMA, Yuta. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod Med Biol**, v. 16, n. 2, p. 99-117, mar. 2017.

YOU DIM, KURESH A; AVDEEF, ALEX; ABOTT, N. JOAN. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. **Drug Discovery Today**, v.8, p. 997-1003, nov. 2003.

ZHANG, E; CHU, Fulong; XU, Lixu; LIANG, Hao; SONG, Shuliang; JI, Aiguo. Use of fluorescein isothiocyanate isomer I to Study the Mechanism of Intestinal Absorption of Fucoidan Sulfate In vivo and In vitro. **Biopharm Drug Dispos**, [s. l.], v. 39, p. 298-307, 1 jun. 2018.

ZHU, Meng-Liang; LIANG, Xin-Li; ZHAO, Li-Jun; LIAO, Zheng-Gen; ZHAO, Guo-Wei; CAO, Yun-Chao; ZHANG, Jing; LUO, Yun. Elucidation of the Transport Mechanism of Baicalin and the Influence of a Radix Angelicae Dahuricae Extract on the Absorption of Baicalin in a Caco-2 Cell Monolayer Model. **J Ethnopharmacol**, China, v. 150, p. 553-559, 25 set. 2013.