

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Fernanda Rodrigues Galves

Modelos *in vitro* para previsão de absorção gastrointestinal
empregados no desenvolvimento de novos fármacos

Porto Alegre, 2011

Fernanda Rodrigues Galves

Modelos *in vitro* para previsão de absorção gastrointestinal
empregados no desenvolvimento de novos fármacos

Trabalho de Conclusão de Curso
para a aprovação na disciplina de
Estágio Curricular em Farmácia
pela Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Porto Alegre, 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais que sempre foram muito presentes na minha trajetória e me ensinaram os valores da vida que sigo e seguirei para sempre.

Agradeço à minha mãe pela amizade, pelas palavras alegres ditas em momentos difíceis, pelo carinho e amor que sempre preencheram meu coração.

Agradeço a meu pai que é meu grande amigo e um exemplo de pessoa que me guia e me auxilia na vida.

Agradeço a minha irmã pelo companheirismo e momentos divertidos que sempre passamos juntas e a união e cumplicidade que criamos desde cedo.

Agradeço aos meus queridos e inesquecíveis colegas e amigos que me ensinaram muito durante estes quatro anos e meio de convivência, cada um com sua característica especial e todos com muita força de vontade e alegria em comum.

Agradeço ao meu amigo e querido namorado Antônio por ter tornado meus dias mais alegres e por me ensinar a viver a vida com mais intensidade.

Agradeço a minha orientadora profa. Teresa pelo exemplo de profissional, pela ajuda e pelas palavras de apoio durante esta etapa da minha vida.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

Resumo

O desenvolvimento de candidatos a fármacos e o *screening* de novas moléculas pela indústria farmacêutica requer a utilização de ferramentas que facilitem e auxiliem a previsão de propriedades farmacocinéticas como a absorção oral, uma vez que a inadequação da biodisponibilidade oral é um dos principais motivos de descarte de candidatos a fármacos em fase de desenvolvimento. Modelos de absorção *in vitro* são utilizados em estágios iniciais de desenvolvimento com a finalidade de prever a permeabilidade e assim estimar a absorção *in vivo* das moléculas sob investigação. Para esta mini-revisão foram pesquisados alguns modelos de absorção *in vitro* descritos na literatura objetivando verificar e comparar suas características e capacidade de previsão da absorção gastrointestinal em animais e humanos. Células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) e ensaio de permeação em membrana artificial paralela (PAMPA) são os modelos *in vitro* mais descritos na literatura e mais utilizados pela indústria farmacêutica, sendo usados em conjunto ou isoladamente. Outros modelos, como sistema gastrointestinal (TIM) e modelos matemáticos com abordagem fisiológica (PBPK) para descrever os resultados de experimento *ex vivo* de intestino perfundido de ratos, fornecem dados da estabilidade, liberação, dissolução e absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas, sendo empregados menos frequentemente em fase de desenvolvimento.

Palavras-chave: modelos *in vitro*, absorção, Caco-2, PAMPA, TIM, PBPK.

Abstract

The development of drug candidates and the screening of new molecules by the pharmaceutical industry requires the use of tools that facilitate and assist researchers in predicting pharmacokinetic properties such as *in vivo* oral absorption since inappropriate pharmacokinetic properties are major reasons for dropping out of drugs candidates during drug discovery and development. *In vitro* absorption models are used viewing to predict drug permeability and thus estimate its oral uptake in the early stages of development. In this mini-review some absorption *in vitro* models were investigated aiming to verify and compare their characteristics and ability on predicting gastrointestinal absorption in animals and humans. Cells from human colon adenocarcinoma (Caco-2) and parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) are the *in vitro* models more described in the literature and more frequently used by the pharmaceutical industry, in combination or isolated. Other models such as the gastrointestinal tract system (TIM) and physiologically based pharmacokinetic modeling (PBPK) approach to describe the results of experiments *ex vivo* of perfused rat intestine, provide data on drug stability, release, dissolution and absorption from dosage forms, being less frequently employed during drug development.

Keywords: Models *in vitro*, absorption, Caco-2, PAMPA, TIM, PBPK.

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Metodologia.....	11
3. Modelo Caco-2.....	11
4. Ensaio de Permeação de Membrana Artificial Paralela.....	18
5. Modelo Gastrintestinal.....	25
6. Modelos Matemáticos Fisiológicos.....	30
7. Conclusões.....	33
8. Referências.....	34

1. Introdução

A regra-dos-cinco de Lipinski, proposta após análise das propriedades chave dos 50.000 fármacos da base de dados *World Drug Index* (Derwent Company), estabelece que compostos com um peso molecular > 500 Da, coeficiente de partição octanol/água > 5 , número de doadores de hidrogênio > 5 e número de aceptores de hidrogênio > 10 tem maior probabilidade de apresentar baixa absorção quando administrados pela via oral (WATERBEEMD *et al.*, 2001, WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Essa regra tem sido útil na previsão qualitativa e quantitativa da relação absorção/permeabilidade e no conhecimento da semelhança entre fármacos que permitem as melhores propriedades farmacocinéticas (WATERBEEMD *et al.*, 2001). No entanto, se dependesse da utilização pura e simples dessa regra, vários fármacos empregados na terapêutica atualmente, como o antitumoral taxol, o antifúngico nistatina e o imunossupressor ciclosporina, não teriam sido descobertos.

Durante muito tempo, a investigação de novos fármacos focou-se exclusivamente nos efeitos causados no organismo pela administração do composto sob investigação, ou seja, na sua resposta farmacodinâmica, estudando-se ativação ou bloqueio de receptores e a inibição enzimática, entre outros processos. Mais recentemente, no entanto, o conhecimento de resposta biológica foi expandido e incluiu-se a farmacocinética no processo de investigação, ou seja, o estudo da influência do sistema biológico no efeito do fármaco (AVDEEF; TESTA, 2002). Nesse contexto, um dos principais motivos de abandono de moléculas candidatas a fármacos na fase de desenvolvimento é a baixa absorção oral, ou seja, uma propriedade farmacocinética inadequada da molécula (WATERBEEMD *et al.*, 2001).

O perfil farmacêutico, baseado nas propriedades físico-químicas de compostos, é utilizado como processo complementar para a avaliação da atividade/seletividade de fármacos, buscando-se estruturas químicas nas quais se possa garantir integridade e pureza, solubilidade, permeabilidade, estabilidade e lipofilia adequados, além de se poder controlar a

capacidade de inibição da enzima do citocromo-P450 (KERNS *et al.*, 2004). O conhecimento e controle das propriedades físico-químicas do fármaco são importantes, pois delas dependem os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (KERNS, 2002).

A maioria dos candidatos a fármacos tem seu desenvolvimento direcionado para a administração oral, devido à maior facilidade de utilização e maior adesão do paciente (WATERBEEMD *et al.*, 2001). Entretanto a absorção do fármaco é mais complicada nessa via, em comparação com outras rotas de administração, devido à variabilidade inter-individual do sítio de absorção que pode inclusive degradar o fármaco, gerando diferenças significativas na velocidade e extensão de absorção, descrita através do parâmetro farmacocinético biodisponibilidade (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

O trato gastrintestinal (TGI) é o maior sítio de absorção de fármacos, sendo o intestino delgado - duodeno, jejuno e íleo – o local de maior absorção devido à presença de vilosidades e microvilosidades na parede do lúmen intestinal, formando a borda em escova que aumenta sua área superficial (aproximadamente 200 m²), além da alta perfusão sanguínea da região duodenal (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; WATERBEEMD *et al.*, 2001). O epitélio do TGI tem a função de atuar como uma eficiente superfície de absorção de elementos essenciais da dieta e também como uma barreira seletiva entre o ambiente externo e a circulação sistêmica, prevenindo a entrada de xenobióticos. Os movimentos peristálticos misturam os conteúdos presentes no duodeno, levando o fármaco a entrar em contato com as células da mucosa intestinal e, em função do tempo de contato, ser absorvido (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

A presença de enzimas do complexo citocromo-P450, envolvidas no metabolismo de fármacos, e da glicoproteína de permeabilidade (P-gp), localizada na superfície apical da parede intestinal que media o efluxo de compostos de dentro da célula de volta para o lúmen, são mecanismos de proteção que também limitam a absorção de fármacos pela via oral

(WATERBEEMD *et al.*, 2001). Devido à grande variabilidade de expressão da P-gp na parede da mucosa duodenal, com uma variação em torno de 10 vezes nos níveis de RNA mensageiro da P-gp, uma variabilidade importante na absorção oral pode ser observada (WATERBEEMD *et al.*, 2001).

Os fármacos podem atravessar a membrana intestinal pela via paracelular, que é influenciada pela tensão das junções celulares, e pela via transcelular, comum para compostos altamente polares. Na via transcelular o transporte pode ocorrer de dois modos: por difusão simples - rota mais comum de transporte, e por transporte ativo, utilizando carreadores (TOZER; ROWLAND, 2009).

Na fase de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, modelos de absorção *in vitro* ou *ex-vivo* como perfusão do intestino, utilização de monocamadas de células intestinais ou de membranas artificiais são utilizados a fim de determinar a permeabilidade intestinal de moléculas candidatas a fármacos visando prever sua absorção *in vivo* no TGI (CASTILLO-GARIT *et al.*, 2007). Nesse contexto, uma previsão real da absorção do candidato a fármaco e de sua biodisponibilidade não é apenas um fator importante para a seleção de candidatos, mas é um fator crítico para o desenvolvimento farmacêutico dessa nova entidade química (KUENTZ, 2008).

Visando revisar as ferramentas empregadas pela indústria farmacêutica para prever a absorção de candidatos a fármacos na fase de desenvolvimento, essa mini-revisão objetiva comparar alguns modelos de absorção *in vitro* descritos na literatura a fim de verificar suas características e capacidade de previsão da absorção gastrointestinal em animais e humanos.

2. Metodologia

Para esta mini-revisão foram utilizados artigos obtidos na base de dados ISI Web of Knowledge, pesquisada nos meses de abril a junho de 2011, utilizando as palavras chaves: *absorption model and in vitro*, *pharmacokinetics absorption in vitro*, *absorption Caco2*, *pre-clinical absorption and in vitro* e *models absorption in vitro and Pgp*.

A partir da busca foram escolhidos e pesquisados os modelos mais citados conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1. Palavras chaves utilizadas na pesquisa na base de dados *ISI Web of Knowledge* e número de artigos encontrados utilizando como refino os termos *article* e *review*.

<i>Palavras-chave</i>	<i>Número de artigos encontrados</i>
TNO gastrointestinal model	13
Parallel artificial permeability assay	75
Traditional physiological model	182
Traditional model absorption	
Segregated flow model	12
Caco2 model absorption	72
Absorption Caco2	

Foram selecionados artigos que apresentavam essas palavras chaves e que estavam disponíveis na íntegra, de forma gratuita, no Portal de Periódicos da CAPES. Referências disponíveis *on line* de forma gratuita de alguns artigos selecionados de acordo com esses critérios também foram utilizadas.

3. Modelo Caco-2

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano - Caco-2 - ganhou popularidade na indústria farmacêutica porque permite avaliar a capacidade potencial de absorção intestinal *in vivo* de drogas e fármacos além de permitir a determinação de mecanismos de transportes de um vasto número de candidatos a fármacos (CHONG;

DANDO; MORRISON, 1997). Neste sistema *in vitro*, faz-se o crescimento de uma monocamada da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano sobre um suporte de filtro permeável que é colocado na interface entre o compartimento doador, onde a droga/fármaco se encontra em solução e o compartimento receptor, para onde a droga/fármaco deve penetrar na dependência de sua permeabilidade através da monocamada celular, que apresenta morfologia semelhante ao epitélio intestinal (Figura 1) (WATERBEEMD *et al.*, 2001; VERMA; HANSCH; SELASSIE, 2007).

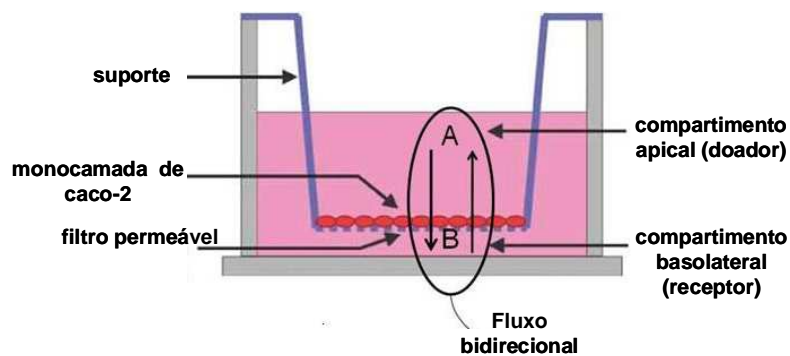


Figura 1. Representação esquemática do ensaio de permeabilidade em células de adenocarcinoma de cólon humano – Caco-2. (Disponível em: www.xenoblis.com/services/absorption/caco-2-permeability).

O modelo Caco-2 permite a investigação do transporte de drogas/fármacos através do epitélio intestinal por diferentes rotas: transcelular passiva, paracelular, mediada por carreador e transcitose (QUARONI; HOCHMAN, 1996).

A caracterização do modelo Caco-2 foi realizada por Pinto (1993)¹, determinando a estrutura e funcionalidade das células através da avaliação de marcadores fenotípicos, determinação das diferenças entre crescimento e células confluentes, observação do crescimento das células *in vitro* em forma colunar, semelhante ao crescimento dos enterócitos presentes nas vilosidades intestinais, observação da presença de borda em escova e complexos

¹ PINTO, M. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p.323-330, 1983 *apud* QUARONI, A.; HOCHMAN, J.. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 22, p.3-52, 1996.

juncionais, além da possibilidade de transporte ativo. Células Caco-2 distinguem-se dos outros modelos celulares de permeação *in vitro*, pois expressam enzimas digestivas na membrana (QUARONI; HOCHMAN, 1996). Em 1993, Hunter e colaboradores verificaram a expressão funcional de glicoproteínas-P (P-gp) na camada apical de Caco-2, característica de grande importância para o estabelecimento de correlação entre os resultados obtidos por esse modelo e os estudos de absorção de fármacos *in vivo*.

Como em outras culturas celulares, as propriedades das células Caco-2 como modelo para investigar a absorção de novas drogas/fármacos podem variar com o tempo de utilização das mesmas no laboratório, devido ao número de replicações das células, o tempo de manutenção da cultura, o suporte para crescimento da cultura e o meio de cultivo (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001). Desse modo, a expressão de P-gp também pode variar entre as preparações de Caco-2 e o transporte de fármacos pode ser saturado devido a utilização de alguns substratos. Essas variações, conseqüentemente, podem dificultar a comparação de resultados de diferentes laboratórios bem como a extrapolação dos resultados *in vitro* para *in vivo* (WATERBEEMD *et al.*, 2001).

Apesar dessas limitações, diversos trabalhos na literatura mostram a utilização do modelo de Caco-2 para avaliar a absorção de fármacos através da membrana intestinal bem como o papel da P-gp no transporte de fármacos.

Li e colaboradores (2005) - da indústria farmacêutica Roche - investigaram o transporte e os perfis de hidrólise de dez pró-fármacos de levovorina (LVV – isômero L da ribavirina), antiviral utilizado no tratamento da infecção de hepatite C, desenhados visando modificar a baixa biodisponibilidade do fármaco, que foram avaliados através do modelo de Caco-2. A partir do modelo foi possível identificar o pró-fármaco com maior permeabilidade na membrana intestinal conforme mostrado na Tabela 2, além de comparar a permeabilidade dos pró-fármacos de éster de mono-aminoácidos e éster de vanililprolinato e prolinilvalinato.

Foi observado um aumento de 48 vezes na permeabilidade do R1518 e um aumento de 4 vezes do seu isômero em comparação ao LVV, concluindo que o R1518 teria um mecanismo de transporte intestinal mediado por carreadores. O pró-fármaco éster de bis-valina aumentou a permeabilidade do fármaco em 72 vezes, porém obteve uma taxa de conversão em LVV de 13%. O pró-fármaco R1518 foi selecionado como um candidato no tratamento da hepatite C devido à sua alta permeabilidade e rápida hidrólise. Os dados obtidos *in vivo* em estudo de farmacocinética em ratos, relatados no mesmo artigo, corroboraram com os resultados obtidos com o modelo Caco-2 *in vitro*.

Tabela 2. Estudo de permeabilidade da levovorina e seus pró-fármacos em modelo Caco-2 (Traduzido de LI *et al.*, 2005).

Compostos	Permeabilidade em Caco-2 (10^{-6} cm/s)	Relação de aumento da permeabilidade	Taxa de conversão (%) de LVV+pró-fármaco em LVV	
			Compartimento apical	Compartimento basolateral
Levovorina	0.12 ± 0.06			
Ribavirina	0.18 ± 0.06	1.5		
LVV-5'-(L)-valina (R1518)	5.70 ± 1.99	47.9	7.6	93.8
LVV-5'-(D)-valina	0.52 ± 0.26	4.4	11.0	2.7
LVV-5'-(L)-isoleucina	1.46 ± 1.09	12.4	5.9	72.8
LVV-5'-(L)-alanina	1.17 ± 0.57	9.9	41.2	100
LVV-5'-(L)leucina	0.88 ± 0.17	7.5	17.4	80.2
LVV-5'-(L)-sarcosina	0.50 ± 0.39	4.3	34.9	100
LVV-5'-(L)-fenilalanina	0.14 ± 0.07	1.2	61.7	67.3
LVV-2',3'-(L)-bis-valina	8.55 ± 1.75	72.5	53.4	12.7
LVV-5'-vanililprolinato	3.42±0.18	29.0	99.1	24.1
LVV-5'-prolinilvalinato	1.98 ± 1.04	16.8	5.7	47.9

Wetterich e colaboradores (1996)² utilizaram células Caco-2 no estudo que investigou se o β -bloqueador tanilolol era substrato da P-gp. Os resultados demonstraram um fluxo transcelular significativamente maior na direção basolateral-apical (não-absortiva) do que na direção apical-basolateral do fármaco. A permeabilidade concentração-dependente foi modulada pela adição de verapamil - inibidor da P-gp – confirmando o tanilolol como substrato da P-gp.

Beaumont (2000)³ avaliou a interação de uma sulfamida, antagonista do receptor da neurocinina (NK₂), com a P-gp, que em humanos apresentou biodisponibilidade de 8%, reduzida para 4% após alimentação. A verificação da baixa biodisponibilidade, em parte devido à baixa absorção do fármaco no trato gastrointestinal, fez-se através de dados obtidos com células Caco-2, que indicaram baixa permeabilidade ($1\text{-}2\cdot 10^{-6}$ cm/s) sugerindo um baixo fluxo transcelular da substância no sentido apical-basolateral, e um fluxo na direção basolateral-apical de $17\text{-}19\cdot 10^{-6}$ cm/s, indicativo da presença de transportador de efluxo, confirmando a interação da sulfamida com a P-gp (WATERBEEMD *et al.*, 2001).

A correlação entre a permeabilidade através das monocamadas de Caco-2 e a extensão de absorção de fármacos *in vivo* foi demonstrada por Stewart e colaboradores (1995)⁴. Os autores determinaram a permeabilidade *in vitro* no modelo Caco-2 para uma série de seis compostos não peptídicos que exibem absorção em humanos na faixa de 5 a 100%. A permeabilidade dos fármacos situou-se na faixa de $0,5$ a $50\cdot 10^{-4}$ cm/min. Os resultados

² WETTERICH, U. *et al.* Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinlol enantiomers: Concentration and dose dependent absorption *in vitro* an *in vivo*. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p.514-522, 1996 *apud* WATERBEEMD, Han Van de et al. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p.1313-1333, 2001.

³ BEAUMONT, K. Pharmacokinetics and metabolismo of a sulfamide NK₂ antagonist in rat, dog and human. **Xenobiotica**, v. 30, p.627-642, 2000 *apud* WATERBEEMD, Han Van de et al. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p.1313-1333, 2001.

⁴ STEWART, B. H. *et al.* Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: Relationship to absorption in humans. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p.693-699, 1995 *apud* WATERBEEMD, Han Van de et al. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p.1313-1333, 2001.

indicaram que os compostos que apresentaram uma permeabilidade maior que $20 \cdot 10^{-4}$ cm/s foram completamente absorvidos, conforme observado na Figura 2.

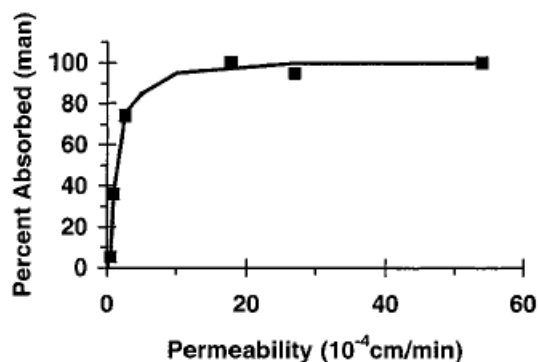


Figura 2. Relação entre permeabilidade *in vitro* em modelo células Caco-2 *versus* extensão de absorção em humanos para uma série de seis compostos (Waterbeemd, Han Van de *et al.* Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 9, p. 1313-1333, 2001. Reimpressão com a permissão de American Chemical Society. Copyright 2011).

A correlação entre resultados obtidos com células Caco-2 e modelo de jejuno humano *in situ* foi testada por Lennernäs e colaboradores (1996). Os autores observaram que, para fármacos com alta e rápida absorção, os resultados de permeabilidade diferiram entre 2 a 4 vezes entre os modelos, indicando que o modelo Caco-2 é excelente para avaliar fármacos absorvidos por transporte passivo. Entretanto para fármacos com baixa e incompleta absorção, a permeabilidade foi de 30 a 80 vezes menor no modelo Caco-2 comparado com modelo *in situ*. As justificativas para a diferença observada podem ser a menor permeabilidade média da linhagem de células Caco2- para a rota paracelular e a menor área superficial para absorção no modelo Caco-2.

A correlação entre a permeabilidade no modelo Caco-2 e absorção *in situ* em jejuno humano também pode ser difícil para fármacos que são absorvidos com mecanismos ativos, que envolvem a presença de carreadores na membrana. Um desses fármacos é a L-DOPA, utilizada no tratamento de síndromes parkinsonianas, que *in vivo* apresenta absorção rápida e completa mediada pelo transportador de dopamina (DAT) e que no modelo Caco-2

apresentou uma permeabilidade efetiva 100 vezes menor. Essa diferença pode ser atribuída à baixa expressão do carreador nas monocamadas do modelo *in vitro*, o que leva a saturação dos mesmos nas condições experimentais. Resultados semelhantes foram relatados para outros compostos que apresentam o mesmo mecanismo de absorção, levando a concluir que as células Caco-2 devem ser caracterizadas previamente quanto à expressão de carreadores antes de se tentar correlacionar resultados *in vitro* com *in vivo* (LENNERNÄS, 1996).

As limitações do modelo Caco-2 relatadas na literatura incluem o custo da cultura celular, o tempo necessário para o crescimento da cultura, uma vez que são necessários 21 dias para formação da monocamada, o baixo rendimento das culturas, a expressão variável de proteínas de transporte e metabolização e complicações na interpretação de dados devido aos diversos mecanismos de permeação possíveis no modelo (KERNS *et al.*, 2004). Outro fator limitante do modelo é a dificuldade de obter resultados fidedignos para compostos lipofílicos que, em geral, apresentam alta permeabilidade e baixa solubilidade, gerando resultados subestimados devido às ligações não-específicas do fármaco aos aparatos do experimento e o efeito da camada de água (*unstirred water layer*) que causa maior resistência à absorção intestinal de fármacos lipofílicos (LAKERAM *et al.*, 2008). A camada de água em humanos refere-se à camada adjacente à parede intestinal criada pela mistura incompleta dos conteúdos do lúmen próximos à superfície da mucosa intestinal, sendo composta por água, muco e glicocálice (LENNERNÄS, 1998). A espessura da camada de água *in vivo* é de aproximadamente 30-100 μm (LAKERAM *et al.*, 2008), diferindo da espessura de 300-800 μm encontrada *in vitro* (LENNERNÄS, 1998).

Como alternativas para aumentar a correlação dos resultados do modelo Caco-2 obtidos *in vitro* com os resultados de absorção *in vivo*, a literatura cita: substituição das células Caco-2 por células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), derivadas do rim de cães que precisam de três dias para alcançar uma diferenciação semelhante às células Caco-2 que

necessitam de 21 dias (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001); adição de albumina no compartimento receptor a fim de aumentar a solubilidade do fármaco e manter a condição *sink*, além de diminuir a ligação de fármacos lipofílicos aos aparatos do ensaio; agitação durante o ensaio para diminuir o efeito da camada de água e a resistência à passagem pela monocamada e uso de tensoativo no compartimento acceptor para aumentar a solubilidade do fármaco permeado e manter a condição *sink* (LAKERAM *et al.*, 2008).

4. Ensaio de Permeação em Membrana Artificial Paralela

O Ensaio de Permeação em Membrana Artificial Paralela (PAMPA), introduzido por Kansy e colaboradores em 1998, é um método simples e rápido que tem a finalidade de mensurar a permeação passiva na ausência de transportadores e sistemas de efluxo (CHEN *et al.*, 2008), sendo muito utilizado na simulação da absorção intestinal humana em pesquisas na área farmacêutica (DREASSI *et al.*, 2009). Desde 2000, o PAMPA tornou-se uma ferramenta padrão na previsão da absorção oral humana de novos candidatos a fármacos nos estágios iniciais de desenvolvimento (VELICKÝ *et al.*, 2010). Além deste sistema prever dados de absorção de fármacos em humanos, também pode ser utilizado no rastreamento da permeabilidade pela barreira hematoencefálica e também na elucidação da relação estrutura-permeabilidade de fármacos (GALINIS-LUCIANI; NGUYEN; YAZDANIAN, 2007).

Esta técnica envolve um suporte de filtro impregnado com diferentes lipídios, o conjunto formando uma membrana artificial, membrana artificial lipídica, sem poros e sem sistema de transporte ativo, que separa dois compartimentos, mimetizando o transporte passivo do fármaco pelo trato gastrointestinal do lúmen para a serosa (VERMA; HANSCH; SELASSIE, 2007), conforme mostrado na Figura 3. A membrana artificial é constituída de lipídios como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e colesterol ou lecitina de ovo em um diluente orgânico, que são depositados sobre filtro

microporoso. A droga ou fármaco sob investigação é diluída em um tampão (pH 7,4) e adicionado ao compartimento “doador” (trato gastrintestinal) e, por difusão passiva, move-se pela membrana artificial para o compartimento “aceptor” (sangue) (KERNS *et al.*, 2004). A taxa de permeação é determinada pela permeabilidade efetiva do componente (P_e) através da membrana. O PAMPA é construído em placas de filtro que servem como suporte para o aquecimento da membrana, sendo acopladas às placas de 96 poços correspondentes. A quantificação da droga/fármaco pode ser realizada em leitores ultravioleta de placas, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV) ou CLAE com detector de massas (CLAE-MS) (FALLER, 2008).

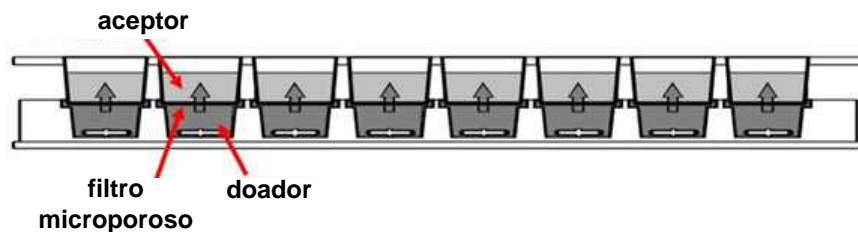


Figura 3. Representação esquemática do ensaio de permeação em membrana artificial paralela. O componente teste pode ser adicionado tanto no compartimento superior quanto inferior, sendo um deles o compartimento doador e o outro o aceitador. (Disponível em: http://www.biotek.com/resources/articles/pampa_assays_epoch.html).

A introdução do modelo PAMPA por Kansy, que utilizou um filtro de membrana impregnado com lecitina de ovo em n-dodecano, estimulou outros grupos a adaptarem e desenvolverem suas próprias versões do modelo, tendo como maior diferença a composição da membrana (VELICKÝ *et al.*, 2010). O modelo mais avançado de derivação do PAMPA é o método *Double-Sink* (DS-PAMPA) introduzido por Avdeef e colaboradores em 2003, que utiliza um gradiente de pH entre as soluções dos compartimentos doador (pH 5,0-7,4) e aceitador (pH 7,4) e um tensoativo iônico para manter a condição *sink* no compartimento receptor, além da presença de ligantes químicos que mimetizam proteínas séricas (FALLER, 2008). Com essas adaptações no modelo obtêm-se uma melhor correlação entre os valores de permeabilidade obtidos no PAMPA e os valores observados em humanos (GALINIS-

LUCIANI; NGUYEN; YAZDANIAN, 2007), uma vez que a maioria dos fármacos são moléculas ionizáveis e por ser a variação de pH uma característica do trato gastrintestinal (FALLER, 2008).

Os vários ensaios do modelo PAMPA descritos na literatura diferem na natureza do material do filtro, na composição da membrana, no pH dos compartimentos acceptor e doador, na presença ou ausência de condição *sink* no compartimento acceptor e tempo de incubação. Um resumo das condições utilizadas está apresentado na Tabela 3 (FALLER, 2008).

Tabela 3. Variações do modelo PAMPA descritas na literatura (Traduzido de FALLER, 2008).

Nome do ensaio	Barreira alvo	Filtro	Solvente	Composição da membrana	pH	Sink	Tempo de incubação
Egg-PAMPA	TGI	PVDF hidrofóbico (125 µm)	n-dodecano	10% lecitina de ovo	Iso 6.5 e 7.4	Não, sais biliares no doador	15h
HDM-PAMPA	TGI	10 µm PC ^a	n-hexadecano	n-hexadecano	Iso 4.0, 6.8-8.0	Não	4h
BM-PAMPA	TGI	PVDF hidrofóbico (125 µm)	1,7-octadieno	3% mistura de fosfolipídios ^b	Iso 6.5	Não	15h
	TGI	PVDF hidrofílico (125 µm)	n-dodecano	1% lecitina de ovo	Iso 5.5 e 7.4	Não	2h
DOPC-PAMPA	TGI	PVDF hidrofóbico (125 µm)	n-dodecano	2% DOPC ^c		Não	15h
DS-PAMPA	TGI	PVDF hidrofóbico (125 µm)	n-dodecano	20% mistura de fosfolipídios	Gradiente de 6.0-7.4	Sim, tensoativo aniônico no acceptor	15h
BBB-PAMPA	barreira hematoencefálica	PVDF hidrofóbico (125 µm)	n-dodecano	2% PBL ^d	Iso 7.4	Não	18h
Skin PAMPA	pele	PVDF hidrofóbico (125 µm)	70% óleo de silicone, 30% IPM ^e	70% óleo de silicone, 30% IPM	Variável (espécies alvos neutras)	Não	7h

Nota: a: fosfatidilcolina; b: mistura de lipídios feita de 33% colesterol, 27% fosfatidilcolina, 27% fosfatidiletanolamina, 7% fosfatidilserina, 7% fosfatidilinositol; c: dioleilfosfatidilcolina; d: lipídio cerebral suíno; e: miristato de isopropila.

A correlação entre os resultados obtidos com o modelo PAMPA e os resultados obtidos com células Caco-2 é importante, uma vez que o segundo modelo se aproxima mais da situação *in vivo*. Na Tabela 4 está mostrada uma comparação das características desses dois modelos de teste de permeabilidade (KERNS *et al.*, 2004).

Tabela 4. Comparação das características de ensaios de permeabilidade dos modelos PAMPA e Caco-2 (Traduzido e adaptado de KERNS *et al.*, 2004).

<i>Características</i>	<i>PAMPA</i>	<i>Caco-2</i>
Composição da membrana	Fosfolipídios em alciano	Monocamada de células Caco-2
Mecanismos de permeabilidade	Difusão passiva	Difusão Passiva Transporte ativo Efluxo Paracelular
Metabolismo	Não	Sim
Rendimento máximo	650 compostos por semana (três placas/dia em duplicata)	50 compostos por semana (duas placas/dia em duplicata em ambas as direções – apical>basolateral e basolateral>apical)

Chen e colaboradores (2008) verificaram a influência da composição da membrana do modelo PAMPA na correlação de permeação com os dados obtidos em modelo Caco-2 e estudo *in vivo* de 12 fármacos produzidos pela empresa Bristol-Myers Squibb. Três composições distintas da membrana do PAMPA foram testadas: modelo 1, membrana tradicional composta de dioleilfosfatidilcolina (DOPC) em n-dodecano; modelo 2, membrana do modelo DS-PAMPA; e modelo 3, membrana de camada tripla (lipídio/óleo/lipídio). Essa nova composição de membrana do modelo 3 foi obtida em três passos. Primeiramente, o hexadecano foi adicionado ao filtro, formando a camada de óleo média. Segundo, uma mistura de fosfolipídios foi dispersa no filtro, formando a camada lipídica do topo e terceiro, a placa foi invertida e adicionou-se uma mistura de fosfolipídios, formando a camada lipídica do fundo. Em cada passo foi utilizado o hexano como carreador. Os resultados de permeabilidade obtidos nos três modelos investigados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Absorção em humanos e permeabilidade *in vitro* de 12 fármacos através de três membranas do modelo PAMPA com composição distinta e modelo Caco-2 (Traduzido de CHEN *et al.*, 2008).

Fármacos		Permeabilidade (10^{-6} cm/s)			
	Absorção humana (FA%)	Caco-2	Modelo PAMPA 1	Modelo PAMPA 2	Modelo PAMPA 3
Sulfasalazina	12	0.4±0.1	0.0 ± 0.0	0.1	0.24 ± 0.15
Nadolol	33	1.7 ± 0.4	0.28 ± 0.04	0.1	0.00 ± 0.00
Norfloxacino	35	1.9 ± 0.3		0.1	0.52 ± 0.47
Etoposido	50	1.8 ± 1.0		3.5	0.11 ± 0.19
Acebutalol	55	4.0 ± 0.4	0.03 ± 0.01	1.1	0.18 ± 0.08
Cetoprofeno	90	25.0 ± 2.6	0.05 ± 0.01	1.0	4.60 ± 0.29
Propranolol	90	17.5 ± 2.6	14.3 ± 0.1	62.8	8.08 ± 1.02
Dexametasona	95	13.4 ± 1.3		27.8	2.71 ± 0.41
Metoprolol	95	12.0 ± 1.0	0.41 ± 0.05	34.2	4.27 ± 0.12
Antipirina	100	28.8 ± 3.5	0.74 ± 0.06	1.4	8.42 ± 0.32
Caféina	100	33.1 ± 2.7	1.2 ± 0.1	1.9	9.58 ± 0.63
Naproxeno	100	30.0 ± 4.1	0.34 ± 0.01	3.3	6.77 ± 0.49

Na Tabela 5 é possível observar que os compostos considerados de alta absorção foram subestimados ou não alcançaram concentração mínima que permitisse quantificação utilizando-se o modelo PAMPA 1, sendo que apenas para o propranolol foi possível obter-se correlação com os dados *in vivo* e do modelo Caco-2. No modelo PAMPA 2 foi possível quantificar a maioria dos compostos, porém o cetoprofeno foi subestimado pelo modelo. No modelo PAMPA 3 os compostos de alta absorção obtiveram valores altos de permeabilidade e os compostos de baixa (< 50%) e moderada (50-89%) absorção tiveram a permeabilidade sub ou superestimados pelo modelo.

Na Figura 4 é possível observar a correlação entre os dados dos 3 modelos de ensaio PAMPA e Caco-2. Na figura 4A, os valores de permeabilidade determinados no PAMPA usando membrana tradicional (modelo 1) e os valores obtidos no modelo Caco-2 não puderam ser correlacionados. Na Figura 4B pode-se observar uma melhor correlação entre as permeabilidades obtidas no modelo DS-PAMPA e Caco-2, no entanto sem significância. Um

coeficiente de correlação de 0,84 foi obtido quando a permeabilidade obtida no modelo PAMPA 3 foi comparada com a permeabilidade determinada em células Caco-2, indicando que o modelo de membrana tripla melhor se aproxima do modelo de células intestinais para avaliar a permeação de fármacos.

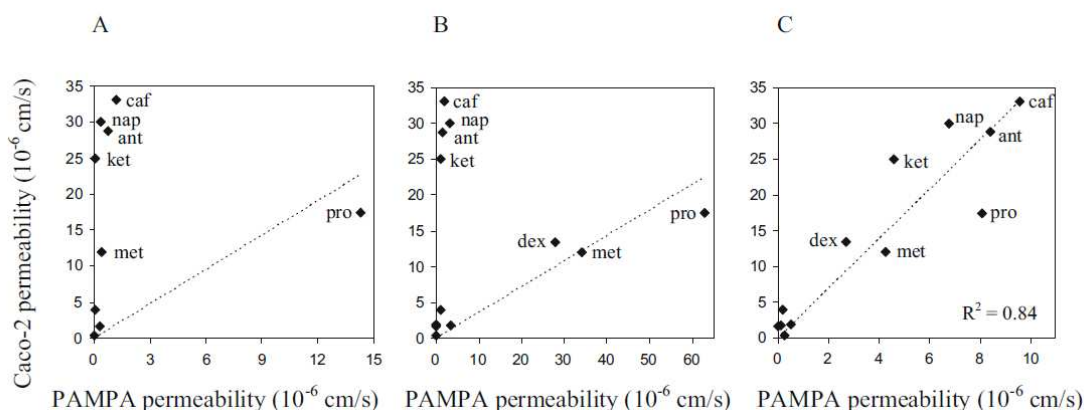


Figura 4. Comparação da curva de correlação Caco-2/PAMPA de 3 modelos de PAMPA. A: modelo de PAMPA tradicional; B: modelo DS-PAMPA; C: modelo PAMPA com membrana de tripla camada. ant = antipirina, caf = cafeína, dex = dexametasona, ket = cetoprofeno, met = metoprolol, nap = naproxeno, pro = propranolol (Chen, Xiaoxi *et al.* A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 7, p. 1511-1520, 2008. Reimpressão com a permissão de Springer Science+Business Media).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) classifica os fármacos de acordo com critérios de solubilidade e permeabilidade, visando determinar qual o fator limitante para o processo de absorção após administração oral. A permeabilidade *in vivo* de compostos de baixa e alta permeabilidade (absorção oral em humanos é maior que 90%) deveria ser, em tese, refletida adequadamente pelos modelos *in vitro*, inclusive o PAMPA. Nesse contexto, o modelo PAMPA de camada tripla foi o único capaz de fornecer uma boa correlação com os valores de absorção em humanos, conforme mostrado na Figura 5. Os resultados indicaram que valores de permeabilidade *in vitro* maiores que $1,5 \times 10^{-6}$ cm/s indicam fármacos com alta absorção em humanos e valores menores que $1,5 \times 10^{-6}$ cm/s, fármacos com baixa absorção (CHEN *et al.*, 2008).

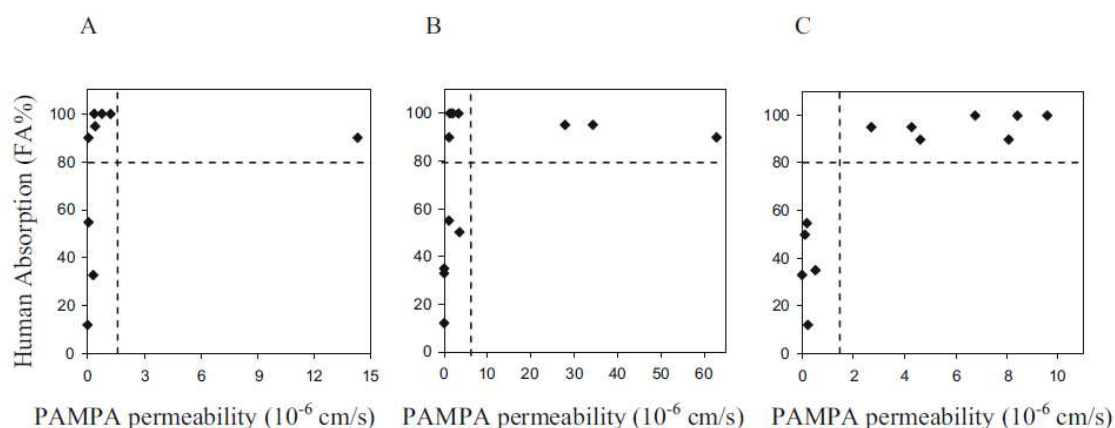


Figura 5. Comparação da correlação na absorção em humanos/modelo PAMPA de três tipos do ensaio, retirado de CHEN et al, 2008. A: modelo de PAMPA tradicional; B: modelo DS-PAMPA; C: modelo camada tripla. A linha tracejada na horizontal separa compostos de alta e baixa absorção em humanos. A linha tracejada na vertical separa compostos de alta e baixa permeabilidade no ensaio PAMPA propranolol (Chen, Xiaoxi *et al.* A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 7, p. 1511-1520, 2008. Reimpressão com a permissão de Springer Science+Business Media).

O estudo de correlação entre os modelos PAMPA, Caco-2 e dados de absorção em humanos permitiu determinar que a membrana de camada tripla proposta para o modelo PAMPA permite maior previsibilidade dos resultados obtidos com Caco-2 e *in vivo*, sendo mais indicada para avaliação *in vitro* de novos fármacos (CHEN *et al.*, 2008).

5. Modelo Gastrintestinal (TIM)

O modelo gastrintestinal desenvolvido pela empresa holandesa *TNO Quality of Life* (TNO Gastrointestinal Model - TIM), cujos esquemas estão apresentados nas Figuras 6 e 7, simula o trato gastrintestinal em diferentes estágios da vida (infantil, adulto e idoso), no estado alimentado ou em jejum, em condições fisiológicas ou patológicas, de acordo com dados obtidos em estudos prévios em voluntários (BLANQUET *et al.*, 2004), sendo muito utilizado para a avaliação da absorção de nutrientes. O TIM é um modelo multi-compartimental dinâmico e controlado por computadores que permite a reprodução *in vitro* de parâmetros *in vivo* como: pH, temperatura corporal, peristaltismo, secreção gástrica/biliar e

pancreática, absorção de água e nutrientes e microbiota. Este modelo tem utilidade na determinação da estabilidade, liberação, dissolução e absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas. O modelo gastrointestinal é dividido em TIM-1, que simula o estômago, duodeno, jejuno e íleo (intestino delgado) e TIM-2, que simula o cólon (TENJARLA *et al.*, 2007).

Cada um dos quatro compartimentos em série do TIM-1 é constituído por uma unidade de vidro e uma parede interna flexível (Figura 6). Os movimentos peristálticos são mimetizados pela alteração da pressão da água que comprime e relaxa alternadamente a membrana interna flexível, misturando o “quimo”. Válvulas peristálticas conectadas aos compartimentos controlam o trânsito do quimo e um sensor de pressão monitora o volume do mesmo. O mecanismo de *feedback* do sensor de bombeamento é utilizado regularmente para ajuste de pH, através da adição de ácido clorídrico ou bicarbonato de sódio, e para monitorar eletrólitos, pepsina, lipase, pancreatina e teor de sais biliares. A remoção de produtos digeridos ou componentes dissolvidos de baixo peso molecular dos compartimentos do jejuno e íleo é feita via diálise, através de uma membrana semipermeável, a fim de prevenir a inibição de enzimas que poderia ser causadas pelo acúmulo de metabólitos (TENJARLA *et al.*, 2007).

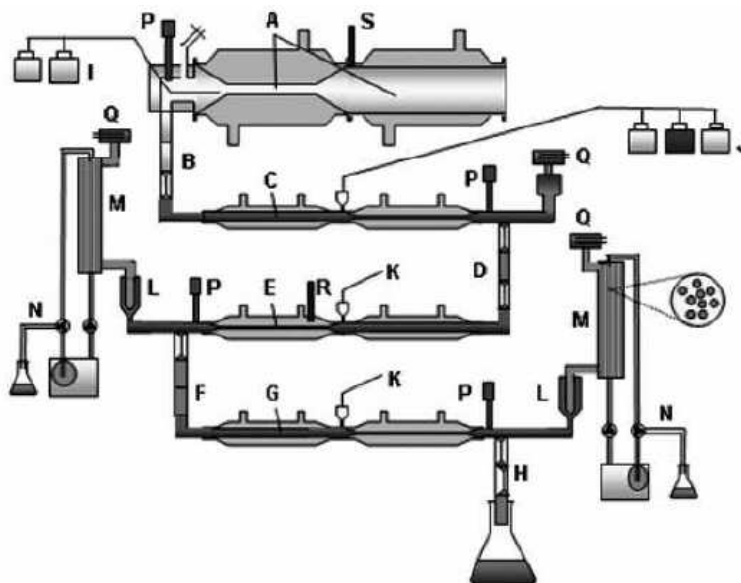


Figura 6. Modelo gastrointestinal TIM-1: A = compartimento estomacal, B = esfíncter pilórico, C = compartimento duodenal, D = válvula peristáltica, E = compartimento jejunal, F = válvula peristáltica, G = compartimento do íliacal, H = esfíncter íleo-cecal, I = secreção do estômago, J = secreção do duodeno, K = secreção do jejuno/íleo, L = pré-filtro, M = membrana semipermeável, N = absorção da água, P = eletrodos de pH, Q = sensores de nível, R = sensor de temperatura, S = sensor de pressão (Tenjarla, Srini *et al.* Release of 5-Aminosalicylate From an MMX Mesalamine Tablet During Transit Through a Simulated Gastrointestinal Tract System. *Advances In Therapy*, v. 24, p. 826-840, 2007. Reimpressão com permissão de Springer Science+Business Media).

No TIM-2 há simulação das condições existentes no cólon proximal, transversal e distal (Figura 7). Esse modelo diferencia-se do TIM-1 pelo ambiente anaeróbico que é mantido através de fluxo contínuo de nitrogênio gasoso no sistema. Essas condições permitem o crescimento de uma microbiota metabolicamente ativa, complexa e de alta densidade, semelhante ao ambiente *in vivo*. A microbiota utilizada no sistema é obtida de voluntários saudáveis. Para assegurar a viabilidade e a atividade da microbiota, monitora-se constantemente a taxa de produção de ácidos no meio. O meio de cultura necessário para o crescimento bacteriano é adicionado regularmente ao sistema através da válvula íleo-cecal enquanto que a remoção de produtos de fermentação como ácidos graxos de cadeia curta é feita por diálise, do mesmo modo que no TIM-1 (TENJARLA *et al.*, 2007).

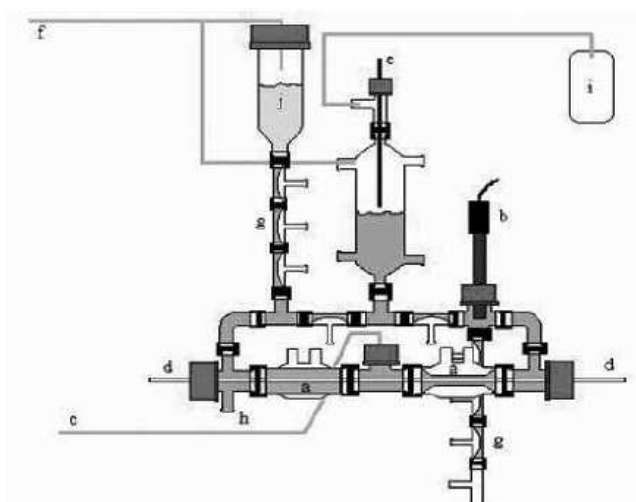


Figura 7. Modelo gastrointestinal TIM-2: a = compartimento peristáltico, b = eletrodos de pH, c = bomba alcalina, d = circuito líquido de diálise com fibras ocas, e = sensor de nível, f = entrada de nitrogênio gasoso, g = entrada e saída pelo esfíncter, h = local de amostragem, i = entrada de nitrogênio gasoso, j = recipiente de efluente do (Tenjarla, Srini *et al.* Release of 5-Aminosalicylate From an MMX Mesalamine Tablet During Transit Through a Simulated Gastrointestinal Tract System. *Advances In Therapy*, v. 24, p. 826-840, 2007. Reimpressão com permissão de Springer Science+Business Media).

Dados cinéticos da liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas e a sua fração disponível para absorção são fornecidos pela quantificação do mesmo no dialisado de jejuno, íleo ou de cólon obtido por difusão passiva através da membrana semipermeável que está conectada aos compartimentos (BLANQUET *et al.*, 2004; TENJARLA *et al.*, 2007), já o efluente proveniente do íleo indica dados da fração do fármaco que não está potencialmente disponível para absorção no intestino delgado, por não estar solúvel nas condições apresentadas (TENJARLA *et al.*, 2007). Este tipo de sistema pode ser uma ferramenta útil em estudos farmacêuticos para prever o caminho dos componentes do medicamento ou de cepas probióticas no trato gastrintestinal em condições dinâmicas, além de onde e quando o fármaco é liberado, influências na sua liberação, na sua estabilidade e o trânsito gastrintestinal (BLANQUET *et al.*, 2004).

Os modelos TIM só podem ser utilizados para fármacos cujo processo de absorção após administração oral ocorre somente por difusão passiva. Os fármacos cuja absorção

também envolve transporte ativo não podem ser avaliados devido à ausência de células de mucosa no modelo. No entanto, quando o transporte ativo não é um fator limitante do processo de absorção, o sistema ainda tem aplicabilidade (BLANQUET *et al.*, 2004).

Os modelos TIM tem como vantagens uma boa correlação com os resultados dos estudos *in vivo*, boa reprodutibilidade de resultados, exatidão, facilidade de manipulação e a possibilidade de coleta de amostras em qualquer porção do trato gastrointestinal e em qualquer momento da digestão (BLANQUET *et al.*, 2004).

Blanquet e colaboradores (2004) aplicaram o TIM-1 visando mostrar a aplicação do modelo na investigação do comportamento das formas farmacêuticas administradas oralmente e o destino dos fármacos liberados a partir das mesmas. O estudo utilizou o analgésico e antipirético paracetamol utilizado nas formas farmacêuticas de liberação imediata e sustentada. Os resultados obtidos no sistema gastrointestinal *in vitro* puderam ser relacionados aos obtidos *in vivo* em humanos mostrando a aplicabilidade do sistema para avaliar o comportamento dos sistemas de liberação dos fármacos no trato gastrointestinal.

Tenjarla e colaboradores (2007) utilizaram o modelo TIM para avaliar a liberação e a biodisponibilidade do antiinflamatório ácido 5-aminosalicílico (5-ASA ou mesalamina) a partir da MMX Mesalamina[®], que é uma forma farmacêutica utilizada para administração de dose única diária de 5-ASA para o tratamento de colite ulcerativa, em estado de jejum e na presença de alimentos. Os resultados indicaram que a bioacessibilidade em ambos os estados mostrou-se similar, que durante 5 a 6 h de trânsito através dos compartimentos gástrico, duodenal, jejunal e ilíaco menos de 1% da dose de 1,2 g administrada foi liberada da forma farmacêutica, que houve uma liberação máxima do fármaco no compartimento que simula o cólon e uma mínima liberação no intestino delgado, levando os autores a propor um mecanismo de liberação do 5-ASA da MMX Mesalamina[®]. O mecanismo proposto para liberação do fármaco neste medicamento, pH dependente e com revestimento

gastroresistente, é a liberação do 5-ASA em pH 7.0 ou maior, devido ao rompimento do revestimento. A interação dos excipientes hidrofílicos com os fluidos intestinais causa o aumento de tamanho da forma farmacêutica e a formação de um gel externo viscoso que liberaria lentamente, por difusão, o 5-ASA no cólon, prolongando a atividade da MMX Mesalamina[®] no paciente.

6. Modelos Matemáticos Fisiológicos

Os modelos farmacocinéticos fisiológicos (*Physiologic Based Pharmacokinetic Model* - PBPK) são esquemas desenvolvidos para permitir a modelagem matemática dos processos de absorção intestinal, metabolismo e secreção baseados em preparações de intestino perfundido de rato (SUN; PANG, 2009), sendo conhecidos o modelo tradicional (TM) e o modelo de fluxo segregado (SFM) (Figura 8). O esquema do modelo permite a identificação de parâmetros importantes para o processo fisiológico como o fluxo sanguíneo para o intestino, por exemplo, a definição das equações diferenciais que descrevem os processos e a determinação de parâmetros farmacocinéticos como depuração (*clearance*), que caracterizam o processo de eliminação.

Schurgers e De Blay (1997)⁵ verificaram que aproximadamente 60 a 70% do fluxo sanguíneo intestinal era distribuído para a mucosa e submucosa devido à alta demanda metabólica e, que o fluxo remanescente, perfundia a camada de enterócitos das vilosidades, onde há grande atividade de absorção e metabolização, além da presença da P-gp. Este estudo demonstrou a importância de adaptar modelos fisiológicos com diferença na perfusão sanguínea nas camadas do intestino delgado para descrever o processo de metabolismo e

⁵ SCHURGERS, N.; DE BLAY, C. J. Influence of blood flow on the absorption of theophylline from the jejunum of the rat. **Pharmaceutical Research**, v. 1, p. 23-27, 198 *apud* CONG, Diem; DOHERTY, Margaret; PANG, K. Sand. A New Physiologically Based, Segregated-Flow Model to Explain Route-Dependent Intestinal Metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, n. 2, p. 224-235, 2000.

absorção intestinal. Os modelos fisiológicos tradicionais assumem que 100% do fluxo sanguíneo intestinal localiza-se na camada absorptiva do intestino delgado (CONG; DOHERTY; PANG, 2000).

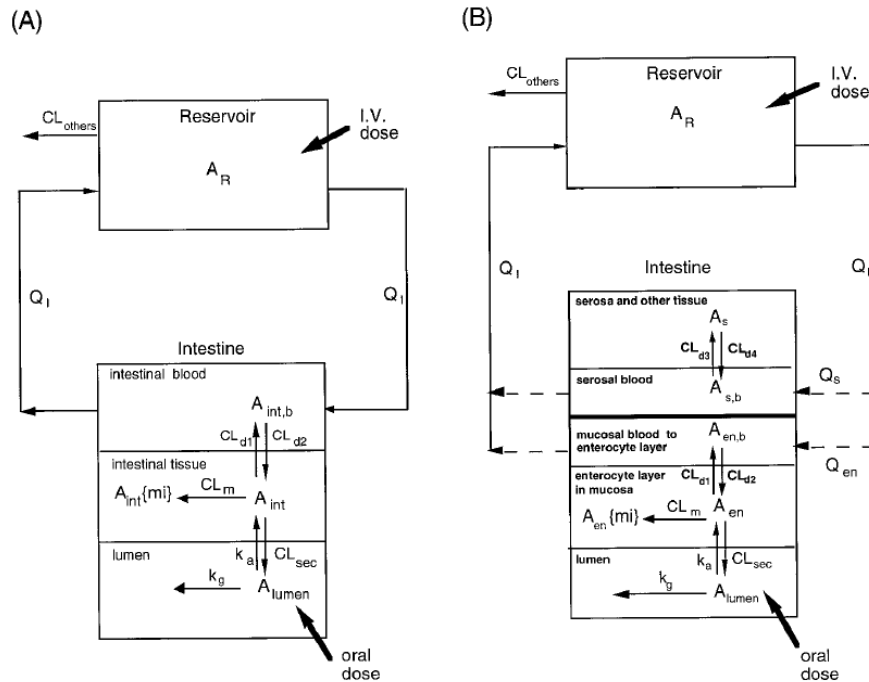


Figura 8. Representação esquemática do TM (A) e SFM (B) para absorção intestinal, metabolismo e secreção de substratos administrados pelas vias intravenosa e oral. **Para ambos os modelos** - Q_1 : taxa de fluxo sanguíneo da artéria mesentérica inferior para o tecido e o retorno para o compartimento central (A_R) pela veia porta; k_a : coeficiente de absorção do fármaco; k_g : coeficiente de eliminação luminal por metabolismo, excreção fecal ou trânsito gastrintestinal; CL_m : *clearance* intrínseco do metabólito; CL_{sec} : *clearance* intrínseco por efluxo. **No modelo A**, o CL_{d1} e CL_{d2} representam o *clearances* de troca do substrato entre o compartimento celular e vascular. **No modelo B** - CL_{d3} e CL_{d4} indicam o *clearance* do fármaco entre os compartimentos sanguíneo e tecidual da serosa, ocorrendo o equilíbrio do fármaco entre os compartimentos e o CL_{d1} e CL_{d2} que representam o *clearance* de transferência do fármaco nos compartimentos mucosa-sangue/enterócito-sangue, ocorrendo o equilíbrio do fármaco nos compartimentos (Cong, Diem; Doherty, Margaret; Pang, K. Sand. A New Physiologically Based, Segregated-Flow Model to Explain Route-Dependent Intestinal Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 28, n. 2, p. 224-235, 2000. Reimpressão com permissão de Springer Science+Business Media)

O TM (Figura 8A) identifica parâmetros do trânsito gastrintestinal, fluxo, enzimas e transportadores intestinais como variáveis que regulam a absorção de substratos administrados oralmente (SUN; PANG, 2009). Neste modelo o intestino delgado é dividido em sub-compartimentos: vascular (sangue intestinal), celular (tecido) e luminal, considerando que o tecido é perfundido totalmente pelo fluxo sanguíneo intestinal.

O SFM (Figura 8B) - expansão do TM – foi desenvolvido por Cong e colaboradores (2000) a fim de explicar a maior extensão do metabolismo intestinal que está associado à administração oral do fármaco comparado com a administração sistêmica, isto é, a rota dependente do metabolismo intestinal (CONG; DOHERTY; PANG, 2000, SUN; PANG, 2009). A partir desse modelo pode-se investigar a participação do fluxo sanguíneo intestinal, metabolismo intestinal, secreção, e *clearances* intrínsecos, características dos substratos (difusão-limitada *versus* distribuição limitada pelo fluxo) e a presença de rotas de eliminação em órgãos paralelos para prever o *clearance* intestinal e a disponibilidade sistêmica de fármacos (CONG; DOHERTY; PANG, 2000).

Nos dois modelos mostrados na Figura 8, o organismo é representado pelo compartimento central (reservatório A_R), onde o fármaco é diretamente depositado quando administrado pela via intravenosa, chegando ao intestino pela via sanguínea que irriga esse órgão. Quando administrado pela via oral, o fármaco tem que atravessar barreiras intestinais sendo “depurado” de uma barreira para a outra até chegar à corrente sanguínea. A diferença entre os dois modelos está na consideração dos diferentes fluxos sanguíneos que devem ser utilizados para descrever a depuração do fármaco até chegar à corrente sanguínea após administração oral, conforme indicado anteriormente. Assim, os resultados de estudos *ex vivo* obtidos do modelo de intestino perfundido de rato, podem ser matematicamente modelados visando descrever detalhadamente o processo de absorção.

O TM e SFM se assemelham pela ligação do compartimento central com o tecido intestinal através da circulação, por considerarem apenas transporte de primeira ordem e processos de eliminação e por assumirem que o fármaco está completamente na forma livre, não se ligando a proteínas plasmáticas (CONG; DOHERTY; PANG, 2000). Estes modelos ilustram a influência do fluxo sanguíneo intestinal, da constante de absorção, das atividades de secreção e metabolização intestinal e dos *clearances* na biodisponibilidade sistêmica de

fármacos administrados pela via oral e permitem uma compreensão mais global do processo de absorção (CONG; DOHERTY; PANG, 2000). A descrição matemática do modelo está além do escopo dessa mini-revisão, podendo ser encontrada nos artigos de CONG, DOHERTY & PANG (2000) e SUN & PANG (2009).

7. Conclusões

Para esta mini-revisão foram apresentados os modelos de absorção *in vitro* mais citados na base de dados *ISI Web of Knowledge* que são utilizados tanto na investigação da permeabilidade intestinal de drogas sob investigação como na avaliação do desempenho de fármacos disponíveis no mercado quando incorporados em novas formas farmacêuticas.

A partir dos artigos revisados pode-se observar que as células Caco-2 ainda são a ferramenta padrão utilizada na indústria farmacêutica com a finalidade de *screening* na busca de candidatos a fármacos. O modelo PAMPA está sendo muito utilizado em combinação com as células Caco-2 visando complementar os resultados de transporte passivo e ativo, uma vez que somente permite avaliar o transporte passivo de fármacos. Além disso, o modelo PAMPA é mais rápido, barato e menos trabalhoso do que a utilização das células Caco-2 que requerem dias para se diferenciar, gastos com meio de cultura e além das dificuldades de interpretação de resultados devido a diferente expressão da P-gp das células epiteliais.

O modelo multicompartimental TIM mimetiza as particularidades do trato gastrointestinal, sendo muito utilizado para prever dados de absorção de nutrientes, vitaminas e compostos em alimentos, porém pouco encontrou-se na literatura sobre sua utilização. No desenvolvimento de candidatos a fármacos, o TIM pode ser utilizado na avaliação da estabilidade, liberação, dissolução e absorção a partir da forma farmacêutica.

A abordagem fisiológica para modelar matematicamente os resultados dos estudos de permeação *ex vivo* utilizando intestino perfundido de rato consideram a importância do fluxo

sanguíneo no intestino delgado na previsão da absorção de fármacos. Com este tipo de abordagem é possível avaliar diferentes parâmetros farmacocinéticos do processo de absorção, inclusive a fase de metabolização, permitindo uma compreensão mais global dos fatores que afetam a absorção.

Pode-se concluir a partir desta mini-revisão que os modelos *in vitro* são indispensáveis nas etapas iniciais de desenvolvimento de fármacos e que os modelos Caco-2 e PAMPA ainda são os mais utilizados e mais citados na literatura com a finalidade de previsão da absorção oral *in vivo*.

8. 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, 2001.

AVDEEF, A.; TESTA, B.. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1681-1689, 2002.

BLANQUET, Stéphanie *et al.* A Dynamic Artificial Gastrointestinal System for Studying the Behavior of Orally Administered Drug Dosage Forms Under Various Physiological Conditions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 4, p. 585-591, 2004.

CASTILLO-GARIT, Juan A. et al. Estimation of ADME Properties in Drug Discovery: Predicting Caco-2 Cell Permeability Using Atom-Based Stochastic and Non-Stochastic Linear Indices. In: **11th INTERNATIONAL ELECTRONIC CONFERENCE ON SYNTHETIC ORGANIC CHEMISTRY**, 2007. Disponível em <<http://www.usc.es/congresos/ecsoc/11/ECSOC11.htm>>. Acesso em: 6 de jun. 2011.

CHEN, Xiaoxi et al. A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1511-1520, 2008.

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**, v. 14, n. 12, p. 1835-1837, 1997.

CONG, Diem; DOHERTY, Margaret; PANG, K. Sand. A New Physiologically Based, Segregated-Flow Model to Explain Route-Dependent Intestinal Metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, n. 2, p. 224-235, 2000.

DREASSI, Elena et al. Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3712-3717, 2009.

FALLER, Bernard. Artificial Membrane Assays to Assess Permeability. **Current Drug Metabolism**, v. 9, p. 886-892, 2008.

GALINIS-LUCIANI, D.; NGUYEN, L.; YAZDANIAN, M.. Is PAMPA a Useful Tool for Discovery? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 2886-2892, 2007.

HUNTER, Janice et al. Functional Expression of P-glycoprotein in Apical Membranes of Human Intestinal Caco-2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14991-14997, 1993.

KERNS, Edward H. et al. Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 6, p. 1440-1453, 2004.

KERNS, Edward H.. High Throughput Physicochemical Profiling for Drug Discovery. **Journal Of Pharmaceuticals Sciences**, v. 90, n. 11, p.1838-1858, 2002.

KUENTZ, Martin. Drug Absorption Modeling as a Tool to Define the Strategy in Clinical Formulation Development. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 2, p. 473-479, 2008.

LAKERAM, Mark et al. Optimisation of the Caco-2 Permeability Assay Using Experimental Design Methodology. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1544-1551, 2008.

LENNERNÄS, Hans. Human Intestinal Permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 4, p. 403-410, 1998.

LENNERNÄS, H. et al. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 127, p. 103-107, 1996.

LI, Fujun et al. Transport of Levovirin Prodrugs in the Human Intestinal Caco-2 Cell Line. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

LIU, Shanjun et al. P-Glycoprotein and an Unstirred Water Layer Barring Digoxin Absorption in the Vascularly Perfused Rat Small Intestine Preparation: Induction Studies with Pregnenolone-16 α -carbonitrile. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 9, p. 1468-1479, 2006.

QUARONI, A.; HOCHMAN, J.. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 22, p. 3-52, 1996.

REGAZZO, Daniela et al. The (193–209) 17-residues peptide of bovine b-casein is transported through Caco-2 monolayer. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 1428-1435, 2010.

SHARGEL, Leon; WU-PONG, Susanna; B.C.YU, Andrew. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5 ed. New York: Mcgraw-Hill, 2005.

SUN, Huadong; PANG, K. Sand. Disparity in Intestine Disposition between Formed and Preformed Metabolites and Implications: A Theoretical Study. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 1, p. 187-202, 2009.

TENJARLA, Srinu et al. Release of 5-Aminosalicylate From an MMX Mesalamine Tablet During Transit Through a Simulated Gastrointestinal Tract System. **Advances In Therapy**, v. 24, p. 826-840, 2007.

TOZER, Thomas N.; ROWLAND, Malcolm. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: As Bases Quantitativas da Terapia Farmacológica**. Tradução Eduardo C. Palma, Helen Pedroni, Teresa Dalla Costa. Porto Alegre: Artmed, 2009.

VELICKÝ, Matej et al. In Situ Artificial Membrane Permeation Assay under Hydrodynamic Control: Permeability-pH Profiles of Warfarin and Verapamil. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 1644-1658, 2010.

VERMA, Rajeshwar P.; HANSCH, Corwin; SELASSIE, Cynthia D.. Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 21, p. 3-22, 2007.

WATERBEEMD, Han Van de et al. Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 1313-1333, 2001.

WATERBEEMD, Han Van de; GIFFORD, Eric. ADMET In Silico Modelling: Towards Prediction Paradise? **Nature Reviews-drug Discovery**, v. 2, p.192-203, 2003.