

# **PADRONIZAÇÃO DO MODELO *IN VITRO* DE MONOCAMADAS DE CÉLULAS CACO-2 PARA ESTUDOS DE PERMEABILIDADE DE CANDIDATOS A FÁRMACOS POR ADMINISTRAÇÃO ORAL**

Soraia Santana de MOURA, Lara Barroso BRITO, Marize Campos Valadares BOZINIS

Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia – FarmaTec – LFTC.

Palavras-chaves: células caco-2, permeabilidade intestinal, *in vitro*, monocamada.

## **1. INTRODUÇÃO**

A demanda de novos fármacos aumentou progressivamente nos últimos anos e os estudos para avaliar suas propriedades farmacológicas, toxicológicas e farmacocinéticas são determinantes nesse processo (YAMASHITA et al., 2002).

Neste sentido, estudos sobre as várias vias de absorção de fármacos têm sido bastante explorados, e dessa forma, a via oral continua se destacando como a via preferencial de administração devido à maior adesão ao tratamento pelos pacientes, e ausência de dor (SOUZA, FREITA e STORPITIS, 2007).

A triagem para a descoberta de fármacos potenciais é o maior desafio para a indústria farmacêutica e requer a realização de métodos experimentais (*in situ*, *in vitro* e *in vivo*) para determinar o perfil biológico dos fármacos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de forma a predizer seu comportamento *in vivo* e seus mecanismos (CASTILLO et al., 2006; GAN e THAKKER, 1996). Pelo exposto, as propriedades de permeabilidade é um passo crucial neste processo, o que impulsiona a utilização de um modelo de triagem experimental que seja de alta capacidade, apropriado custo-benefício e alta efetividade na predição da absorção e permeabilidade *in vivo* (BALIMANE e CHONG, 2005).

Na busca por métodos alternativos que diminuam a quantidade de animais de laboratórios, o uso de sistemas *in vitro* baseados em linhagens celulares que mimetizam o epitélio gastrointestinal, como as células Caco-2, vem sendo cada vez mais empregados (GAN e THAKKER, 1996)

O modelo do adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) é amplamente utilizado para testes de permeação e aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) para determinar a classe de permeabilidade de um fármaco e predizer sua absorção *in vivo* através da medição de um coeficiente de permeabilidade aparente *in vitro* (CASTILLO et al., 2006; FERREC et al, 2001). Este sistema consiste na formação de uma monocamada de células aderidas por junções, que quando cultivadas em membranas porosas (insertos 0,4 µm) por 21 dias, se diferenciam

espontaneamente em enterócitos, mimetizando o epitélio gastrointestinal (YAMASHITA et al., 2000; FERREC et al., 2001). A monocamada de células, confluyente e íntegra, gera uma resistência elétrica transepitelial (TEER), cujo valor é usado como controle de uniformidade da monocamada e de junções intercelulares para o início dos testes (CASTILLO et al., 2006).

Com objetivo de otimizar o método tradicional, que requer um período de diferenciação celular de 21 dias, um protocolo de tempo reduzido (4 dias), foi desenvolvido pela Becton Dickinson Bioscience. Neste método alternativo, o uso de uma formulação rica em hormônios e outros fatores de crescimento, de um inserto revestido com colágeno tipo I para facilitar a adesão e proliferação celular e do butirato de sódio como indutor de diferenciação, apresentaram propriedades equivalentes ao ensaio de cultura caco-2 por 21 dias com a vantagem de ser de 4 dias. (BALIMANE e CHONG, 1997; ORCHEL et al., 2005; UCHIDA et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi padronizar o método de 4 dias proposto acima para determinar permeação intestinal de candidatos a fármacos via oral e comparar a densidade celular com o método tradicional de 21 dias.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

As células Caco-2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio basal (MB) constituído por meio DMEM, 4500 mg/L de glicose, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais, 20% de soro fetal bovino, anfotericina B (5,6 mg/L) e penicilina (100 UI/mL), e mantidas em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Foram utilizadas placas de 24 poços que recebiam insertos revestidos com colágeno tipo I para os ensaios de 4 dias, e insertos sem revestimento para os ensaios de 21 dias (0,31 cm<sup>2</sup> de superfície; 0,4 µm de poro) todos obtidos da Becton Dickinson – BD.

Para os experimentos, utilizamos células nas passagens 42 – 48, que foram tripsinizadas - tripsina/EDTA (0,25%/1mM) - por 3 minutos a 37°C e submetidas a leve agitação mecânica para desadesão celular por 2 minutos. A inativação da enzima foi feita com solução (20 mL) de meio DMEM suplementado com 20% de SFB e a suspensão celular foi submetida a uma centrifugação de 1500 rpm por 10 minutos. O pellet de células foi ressuspensão em meio MB e semeado nos insertos com e sem colágeno (2x10<sup>5</sup> células/inserto – 500 µL) e os poços que continham os insertos receberam 1 mL do meio MB.

Após incubação de 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, o meio MB foi retirado cuidadosamente dos poços e insertos, e substituído por meio de crescimento (MC),

constituído de meio MB e MITO® por 48 horas nas mesmas condições ambientais. No quarto dia, o procedimento de troca de meio foi repetido, desta vez, por meio de diferenciação (MD), constituído por DMEM, MITO® e butirato de sódio. A morfologia celular e formação da monocamada foram registradas por microscopia óptica e confirmadas pela medição do TEER em aparelho Millicell® - ERS (Millipore, USA) durante todos os dias de experimento.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Estudos com células caco-2 têm sido amplamente utilizados na triagem experimental de permeabilidade intestinal de fármacos e para prever a absorção *in vivo*. As condições de cultivo estabelecidas por FERREC et al. (2001) permitem obtenção de monocamadas celulares viáveis, uniformes, diferenciadas e funcionais, com permeabilidade seletiva.

Estudos anteriores sugerem valores de resistência elétrica transepitelial (TEER) maiores que 450  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , como efetivos de formação de monocamada com junções intercelulares firmes (CASTILLO et al., 2006). Neste trabalho, comparamos através da medida do TEER e visualização em microscópio óptico a formação das monocamadas celulares em dois protocolos distintos. O primeiro protocolo baseou-se no estudo modificado de redução do tempo e uso de fatores de crescimento fundamentais proposto pela Becton e Dickinson em relação ao protocolo tradicional proposto por FERREC et al. (2001).

A formação da monocamada celular de caco-2 foi registrada através de fotos do primeiro ao último dia de experimento e medida de TEER. Logo após o plaqueamento e durante as primeiras 24 horas, foram observados resíduos celulares particularmente antes da primeira troca de meio (MB por MC), quando então, foi possível registrar a confluência celular (aproximadamente 40-50%).

Após 48 horas, as primeiras junções celulares já começaram a se apresentar no experimento modificado de 4 dias, o que não ocorreu no experimento tradicional de 21 dias. No terceiro e quarto dia, foi observado a formação progressiva da monocamada de células, com aumento gradual da resistência elétrica transepitelial (380 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , 390 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , 457 $\Omega \cdot \text{cm}^2$  e 580 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , respectivamente do primeiro ao quarto dia). Pela comparação dos ensaios, durante os primeiros 4 dias, o experimento tradicional de 21 dias não apresentou no TEER, o que indica a formação das junções celulares. Este resultado não surpreende. Segundo FERREC et al. (2001) para os ensaios de 21 dias é necessário utilizar uma densidade celular maior (2,5x10<sup>5</sup> – 4x10<sup>5</sup> células/inserto) para atingirem confluência satisfatória e formação

da monocamada. Os valores de TEER ( $206\Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $242\Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $216\Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $205\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) neste experimento não mostraram variação significativa até o 15º dia de incubação. Ao final dos 21 dias, o valor de TEER era  $320\Omega\cdot\text{cm}^2$ , e não foi possível identificar microscopicamente a monocamada de células.

Estes resultados mostram uma visível vantagem do experimento modificado de 4 dias em relação ao de 21 dias, no tocante ao tempo de cultura e indução de crescimento celular. Isso se deu pela adição de hormônios fatores de crescimento fundamentais para o desenvolvimento celular presentes na formulação do MITO. Além disso, a proliferação celular sobre a superfície revestida com colágeno tipo I versus a superfície sem revestimento indicou a importância do uso do colágeno tipo I sobre a adesão e proliferação celular. Como exposto por YAMASHITA et al. (2002), a diminuição do tempo de cultivo é um importante fator quando se trata do risco de contaminação por microrganismos e a viabilidade de realização de uma maior quantidade de substâncias a serem testadas nos estudos de permeação de candidatos a fármacos via oral.

Apesar de utilizarmos meio MD, a diferenciação celular não foi comprovada porque os parâmetros que utilizamos não são suficientes para afirmar a presença de enterócitos diferenciados. Marcadores de diferenciação (sucrase – isomaltase, aminopeptidase e fosfatase alcalina) são propostos por FERREC et al. (2001). Estudos estão em andamento para determinarmos estes marcadores.

Outros autores sugerem a utilização de demais parâmetros para analisar a formação da monocamada celular e diferenciação das células nos estudos de permeação. Além do TEER e da visualização microscópica, a expressão de P-gp e microscopia eletrônica para confirmar diferenciação celular foram propostas por UCHIDA et al. (2009). A permeabilidade de compostos de alto e baixo peso molecular (manitol e lúçifer yellow, respectivamente), é proposta por FERREC et al. (2001), para identificar a integridade da monocamada. Estes parâmetros são visados para os próximos passos em nossos estudos.

#### **4. CONCLUSÃO**

Neste trabalho, mostramos que em condições apropriadas, é possível obter monocamadas de células caco-2 em apenas 4 dias, como proposto previamente estudado. A formação da monocamada dessas células, com valores de TEER adequados é o primeiro passo no desenvolvimento dos estudos de permeação *in vitro* e a diminuição do tempo de cultivo nos ensaios é determinante no quesito custo-benefício na triagem de testes de absorção intestinal de candidatos a

fármacos administrados por via oral. Estudos estão em andamento para a determinação da permeabilidade de novos candidatos a fármacos utilizando o modelo de 4 dias de Caco-2.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BALIMANE P., CHONG S. Cell Culture- Based Models for Intestinal Permeability: a Critique. Drug Discovery Today, 2005.

BECTON DICKINSON and COMPANY. Instructions for Use Biocoat® HTS Caco-2 Assay System, 1997.

CASTILLO R., CHIRIBOGA C., FONTANILLA M. Estandarización de un Modelo Basado en Monocapas de Células Caco-2 com Aplicación em Estudios de Absorción de Fármacos. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm, 2006.

FERREC E.L., et al. In vitro Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. ATLA 29, 2001.

GAN L., THAKKER D. Applications of the Caco-2 Model in the Design and Development of Orally Active Drugs: Elucidation of Biochemical and Physical Barriers Posed by the Intestinal Epithelium. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996.

ORCHEL A. et al. Buyrate- Induced Differentiation of Colon Cancer Cells is PKC and JNK dependent. Digestive Diseases and Sciences, vol. 50, nº3, 2005.

SOUZA J., FREITA Z.,STORPITIS S. Modelos *in vitro* para Determinação da Absorção de Fármacos e Previsão da Relação Dissolução/Absorção. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007.

UCHIDA M. et al. A Modified Fast (4 days) 96-well Plate Caco-2 Permeability Assay. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2009.

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

YAMASHITA S. et al. New and Better Protocol for a Short- Term Caco-2 Cell Culture System. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002.