

Fernanda Márcia Ferreira Lavandeira



**Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação
da segurança de novos fármacos**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2014

Fernanda Márcia Ferreira Lavandeira



**Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação
da segurança de novos fármacos**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2014

Fernanda Márcia Ferreira Lavandeira

**Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação
da segurança de novos fármacos**

Atesto a originalidade do trabalho:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora:
Professora Doutora Márcia Carvalho

Sumário

O processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco é complexo, moroso, dispendioso e envolve várias etapas. Após a seleção das moléculas com maior potencial inicia-se uma das etapas mais importantes designada de ensaios toxicológicos pré-clínicos que permite a determinação dos efeitos adversos e do risco que a exposição do novo fármaco tem para o ser humano.

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos integram três áreas distintas: a farmacologia, a farmacocinética e a toxicologia. No entanto, ao longo deste trabalho será abordado apenas o papel fulcral que a bateria de ensaios toxicológicos possui no desenvolvimento de um novo fármaco uma vez que é perante o contributo da área toxicológica que se antecipa o risco e se reduz a probabilidade dos compostos promissores falharem em fases avançadas do processo de pesquisa e desenvolvimento do novo fármaco, evitando-se assim perdas avultadas de recursos materiais e económicos.

Para se realizar os ensaios toxicológicos é necessário cumprir as diretrizes estabelecidas pelas agências reguladoras, sendo que aos Estados Membros da União Europeia incumbe o cumprimento das normas orientadoras estipuladas pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) que define os protocolos a seguir para se efetuar o ensaio de toxicidade por dose única e repetida, o ensaio de toxicocinética, o ensaio de toxicidade sobre a função reprodutora, o ensaio de genotoxicidade, o ensaio de carcinogenicidade, o ensaio de imunotoxicidade e outros ensaios toxicológicos complementares que, mediante as características do novo fármaco, poderão ser necessários por forma a certificar a sua segurança.

Abstract

The process of research and development of new drugs is a complex, time-consuming, and expensive one, and it involves several steps. After selecting the molecules with the greater potential, one begins the preclinical toxicological studies, one of the most important steps that will allow us the assessment of any adverse effects and of the risk of exposing humans to a new drug.

Preclinical toxicological trials comprise three areas: pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology. However, throughout this work one will just approach the essential role the battery of toxicity tests may have in the development of a new drug; in fact, only with the input of the toxicological area can one anticipate the risk and reduce the probability that any promising compounds may fail in an advanced stage of the drug development, avoiding therefore huge losses of material and economic resources.

To perform these toxicological assays, it is mandatory to meet the standards set by the regulatory agencies. As for the European Union members, they must follow the guidelines imposed by the European Medicines Agency (EMA), that defines the protocols to be followed in toxicity studies, through simple and repeated doses, toxicokinetic studies, development and reproductive toxicity studies, genotoxicity studies, carcinogenicity studies, immunotoxicity studies and other complementary toxicity tests that, taking into account the singular characteristics of the new drug, may be required to ensure its safety.

Agradecimentos

À Universidade Fernando Pessoa e respetivos professores pela excelente formação que me proporcionaram ao longo do curso.

À minha orientadora Professora Doutora Márcia Carvalho pelo apoio, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo desta etapa.

Aos meus pais pelo apoio, confiança e investimento depositados ao longo do todo o meu curso.

À minha família e amigos por me terem acompanhado nos bons e maus momentos, tornando a conclusão do meu curso mais simples.

A todos, muito obrigado.

*“Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno.
Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio.”*

Paracelso

Índice

Capítulo I – Introdução.....	1
Capítulo II – Da toxicologia ao desenvolvimento de um novo fármaco	2
Capítulo III - Bateria de ensaios para avaliação da toxicidade e/ou segurança de compostos	7
3.1 Ensaio de toxicidade por dose única.....	12
3.2 Ensaio de toxicocinética	13
3.3 Ensaio de toxicidade por dose repetida.....	16
3.3.1 Ensaio de toxicidade por dose sub-aguda	18
3.3.2 Ensaio de toxicidade por dose sub-crónica	18
3.3.3 Ensaio de toxicidade por dose crónica	18
3.4 Estudos de toxicidade na função reprodutora	19
3.4.1 Estudos de fertilidade	22
3.4.2 Estudos de embriotoxicidade e teratogenicidade	23
3.4.3 Estudos peri e pós-natal.....	23
3.5 Ensaio de genotoxicidade	24
3.6 Ensaio de carcinogenicidade	28
3.7 Ensaio de imunotoxicidade	30
3.8 Ensaio de toxicidade para a população pediátrica.....	31
3.9 Ensaio de tolerância local.....	32
Capítulo IV – Dos ensaios pré-clínicos aos ensaios clínicos	36
Capítulo V – As limitações dos ensaios toxicológicos e a sua evolução	38
5.1. As incertezas dos ensaios pré-clínicos.....	38
5.2 Perspetivas futuras dos ensaios toxicológicos	43
Capítulo VI – Conclusão	46
Capítulo VII - Bibliografia	47

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens das espécies utilizadas nos ensaios pré-clínicos.....	10
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens das diferentes vias de administração.....	12
Tabela 3 – Limitações das diferentes espécies nos estudos de toxicidade para a avaliação da função reprodutiva.....	21

Índice de Figuras

Figura1 – Esquema representativo do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.....	5
--	---

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
CHMP	Comité de Medicamentos para Uso Humano (do inglês <i>Committee for Human Medicinal Products</i>)
CL ₅₀	Concentração letal 50
CYP	Citocromo P450
DL ₅₀	Dose Letal 50
EMA	Agência Europeia de Medicamentos (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLP	Boas Práticas de Laboratório (do inglês <i>Good Laboratory Practice</i>)
ICH	Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos de Uso Humano (do inglês <i>International Conference Harmonisation</i>)
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
LOAEL	Nível mínimo com efeitos adversos observáveis (do inglês <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>)
MFD	Dose máxima possível (do inglês <i>Maximum Feasible Dose</i>)
MTD	Dose máxima tolerada (do inglês <i>Maximum Tolerated Dose</i>)
NCE	<i>New Chemical Entity</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NOAEL	Nível sem efeitos adversos observáveis (do inglês <i>No Observed Adverse Effect Level</i>)
PMDA	Agência do Medicamento e Dispositivos Médicos (do inglês <i>Pharmaceutical and Medical Devices Agency</i>)

PO	Oral (do latim <i>per os</i>)
SC	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato Gastrointestinal
UE	União Europeia
VICH	Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (do inglês <i>Veterinary International Conference on Harmonization</i>)

Capítulo I – Introdução

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo, moroso e dispendioso, que integra uma série de etapas que incluem (i) a síntese de potenciais moléculas, (ii) o planeamento das moléculas, (iii) a identificação das moléculas candidatas, (iv) os ensaios toxicológicos pré-clínicos, (v) os ensaios clínicos, (vi) a autorização de introdução no mercado (AIM), (vii) a comercialização do fármaco e (viii) a farmacovigilância (Hornberg *et al.*, 2004).

Os estudos pré-clínicos são realizados para avaliar potenciais efeitos adversos e riscos para o ser humano, podendo ser agrupados em três categorias: os farmacológicos, os farmacocinéticos e os toxicológicos. Para que esta bateria de ensaios seja realizada seguem-se as normas orientadoras adotadas pelo Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) (*Non-clinical guidelines*) e pela Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos de Uso Humano (*ICH: Safety*) que podem ser consultadas no *site* da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2013).

Atualmente, o aumento do conhecimento sobre o modo de ação de novos fármacos devido à introdução de novas áreas como a toxicogenómica e a proteómica, aliado ao uso de ferramentas científicas como indicadores de toxicidade, tem conduzido a uma redução dos custos do processo de desenvolvimento de novos fármacos. Os estudos toxicológicos pré-clínicos assumem desta forma um papel fulcral nas fases precoces do desenvolvimento de novos fármacos dado que antecipam riscos e, portanto, reduzem a probabilidade de um novo fármaco promissor falhar em etapas mais avançadas e dispendiosas, bem como colocar em risco a saúde do ser humano (Cunnihgam, 2000; Dorato e Buckley, 2006).

Nos próximos anos continuar-se-ão a desenvolver novos métodos almejando tornar os ensaios toxicológicos mais céleres, menos dispendiosos e mais eficazes na previsão dos efeitos adversos para o homem. De facto, há cada vez mais áreas interessadas em evidenciar a importância dos ensaios de toxicidade durante a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, representando assim um grande contributo para a compreensão da relação dose-resposta bem como para a extrapolação de dados obtidos em pesquisas com modelos animais para o homem (Dorato e Buckley, 2006).

Capítulo II – Da toxicologia ao desenvolvimento de um novo fármaco

A Toxicologia é a ciência que se ocupa do estudo dos efeitos adversos de todas as entidades presentes no mercado incluindo os alimentos, os aditivos alimentares, os medicamentos, os cosméticos e os produtos biotecnológicos. Contudo, os conhecimentos sobre esta ciência remontam à pré-história onde o homem utilizava os venenos provenientes de animais e de extratos de plantas para a caça, a guerra e os assassinatos (Gallo, 2001; Langman e Kapur, 2006; Schou e Hodel, 2003).

A partir do século XIX, a área toxicológica sofreu um crescimento exponencial devido ao aumento da produção de fármacos, pesticidas, munições, fibras sintéticas e agentes químicos no mercado, o que fez que com os contributos dados pelos toxicologistas estivessem presentes nas mais variadas áreas. Na área biomédica, os toxicologistas estudam os mecanismos de ação e de exposição aos agentes tóxicos envolvidos em doenças agudas e crónicas, bem como o processo farmacodinâmico associado a esses agentes para a compreensão dos fenómenos fisiológicos. Outras áreas de atuação da toxicologia envolvem a identificação e quantificação dos riscos resultantes da exposição ocupacional e ambiental a agentes tóxicos, o desenvolvimento de diretrizes que visam proteger a saúde humana e o ambiente dos efeitos adversos dos tóxicos, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, de antídotos para as lesões provocadas por xenobióticos e de métodos para estimar o risco (Fowler e Galli, 2007; Gallo, 2001).

A implementação de normas orientadoras na área da toxicologia tem como finalidade subjacente a proteção da saúde pública através do estudo da exposição dos seres vivos aos agentes tóxicos. Numa fase inicial as agências reguladoras focavam-se apenas na prevenção dos efeitos adversos agudos visto que eram rapidamente observados e correlacionáveis com a exposição. Em pleno século XX, as normas estabelecidas pelas agências reguladoras ainda se encontravam na penumbra no que se refere à capacidade de estimar o risco para todas as substâncias que entram no mercado (Gallo, 2001; Kille, 2013).

No entanto, a partir da década de 50, a regulamentação na área toxicológica obteve grandes avanços devido às tragédias observadas ao longo do tempo e ao impulso tecnológico. O incidente trágico que ocorreu com a talidomida, no qual milhares de

crianças nasceram com malformações severas, despoletou o espírito crítico dos toxicologistas e alertou-os para a necessidade do desenvolvimento de estudos que certifiquem a segurança dos fármacos durante o desenvolvimento embrionário, conduzindo assim à implementação de nova legislação que determina as normas orientadoras dos ensaios de toxicidade na função reprodutora. Também o aparecimento de métodos analíticos com elevado grau de sensibilidade e especificidade possibilitou a detecção das substâncias tóxicas e respetivos metabolitos em níveis muito baixos nos tecidos e fluídos biológicos (Gallo, 2001; Patel e Miller, 2012).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos constituem um meio excelente para avaliar os efeitos tóxicos dos compostos uma vez que são conduzidos sob um elevado grau de controlo no que se refere às condições de exposição, à população exposta e à determinação dos efeitos decorrentes da exposição aguda e crónica. Entre as suas principais vantagens citam-se: as amostras são manipuladas sobre condições previamente determinadas, propiciam informação sobre os mecanismos utilizados pelo fármaco e existe a possibilidade de medir vários tipos de resposta e de aceder aos efeitos que a nova entidade tem sobre o hospedeiro e o seu estilo de vida (por exemplo, dieta e comportamento). Por seu turno, estes ensaios evidenciam limitações entre as quais se destacam: a incerteza associada à extrapolação dos dados obtidos em modelos animais para o ser humano; o estilo de vida e as condições ambientais não são controláveis no caso do homem; e as doses administradas bem como a janela terapêutica observada nos animais podem diferir das do homem (Beck *et al.*, 2001).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos são realizados usando testes *in vitro* e *in vivo*. Atualmente há um maior recurso aos testes *in vitro* devido à pressão exercida pela sociedade para reduzir o número de animais usados na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, tendo os toxicologistas adotado a política dos 3 R's, a qual assegura o bem-estar e a redução do stresse nos animais utilizados nos testes *in vivo*, aumentando assim a exequibilidade dos ensaios toxicológicos pré-clínicos. O uso de testes *in vitro* tem demonstrado sucesso em alguns dos ensaios especificados pelas normas orientadoras, entre os quais se destaca o ensaio de genotoxicidade que consiste na detecção de mutações em bactérias (*Salmonella typhimurium* e a *Escherichia coli*) e o ensaio de genotoxicidade que se baseia na exposição de células de mamíferos ao novo fármaco e na consequente observação da sequência de nucleótidos nos genes, do

número de cromossomas e da estrutura de cromossomas (Brusick, 2001; Timbrell, 2009). Contudo, é importante salientar que os testes *in vivo* sustentam a maior fonte de informação para avaliar a segurança e eficácia dos fármacos (Timbrell, 2009).

Tal como acontece com os ensaios toxicológicos pré-clínicos, os ensaios clínicos também apresentam vantagens e desvantagens. As principais vantagens incluem: as condições do estudo encontram-se devidamente delineadas, as respostas aos efeitos terapêuticos são constatadas em humanos e a amostra populacional do estudo integra indivíduos com a doença a tratar. Por outro lado, as desvantagens estão relacionadas com os custos elevados, com a reduzida amostra populacional envolvida no estudo (o que faz com durante a fase IV dos ensaios clínicos apareçam novas reações adversas) e o tempo de exposição utilizado nem sempre corresponde ao período de tempo em que o medicamento é utilizado em contexto real (Timbrell, 2009).

Porém, é importante salientar que o desenvolvimento de um fármaco eficaz e com poucos efeitos adversos envolve um percurso longo e dispendioso que compreende uma série de etapas (Figura 1) desde a descoberta, a pesquisa, o planeamento, a identificação dos compostos candidatos, os ensaios pré-clínicos e os ensaios clínicos, o que faz com que a introdução no mercado de um novo fármaco ronde o valor de um bilião de dólares (Hornberg *et al.*, 2014).

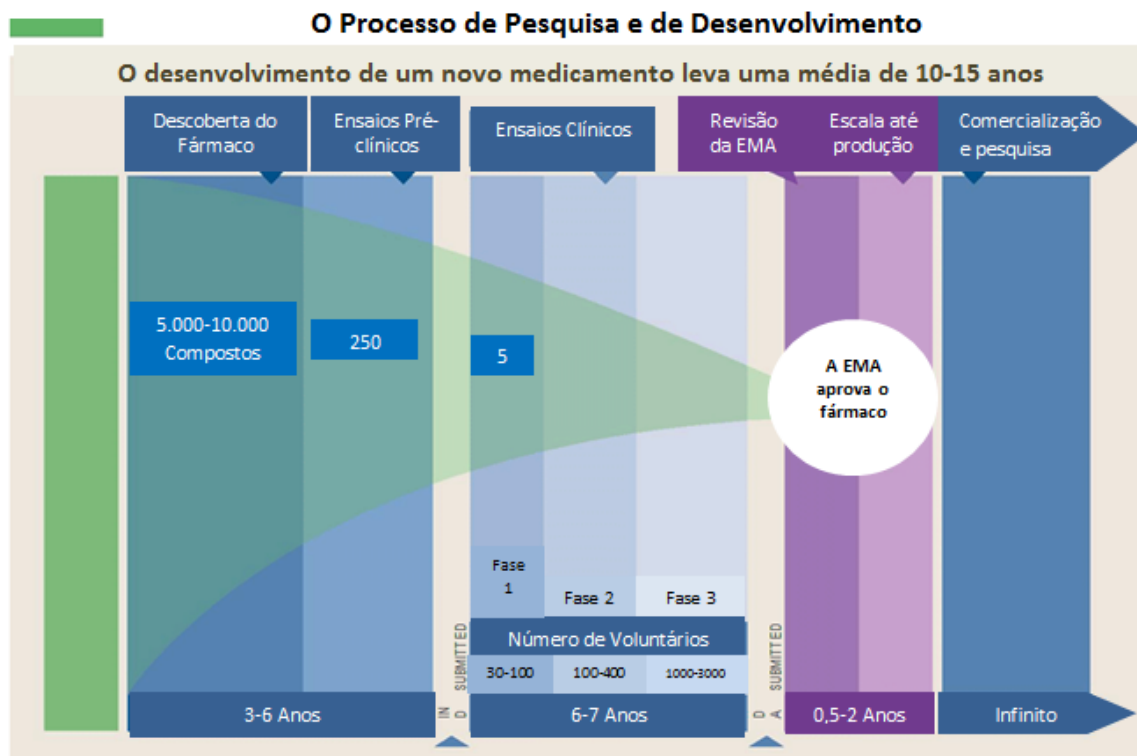


Fig. 1. Esquema representativo do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (fonte: <https://www.icontrolmyhealth.org/treatment-options/pharmaceuticals>)

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco começa pela descoberta ou síntese de uma molécula com base nos mecanismos fisiológicos do ser humano, na relação entre a estrutura da molécula e a estrutura dos recetores do(s) órgão(s) ou tecido(s) alvo e a finalidade terapêutica pretendida. Com base nestes dados começa-se a síntese da nova molécula muitas vezes impulsionada pelo conhecimento empírico das propriedades terapêuticas de produtos de origem natural nomeadamente de plantas, insetos, fungos e bactérias que possuem as propriedades farmacológicas pretendidas para o novo fármaco (Trist, 2011).

De seguida procede-se ao planeamento da molécula, ou seja, a estrutura da molécula é delineada em função dos recetores dos locais alvo onde se pretende que esta interatue de modo a que haja uma elevada afinidade entre a substância ativa e o local alvo. Após a identificação do composto protótipo, efetua-se a otimização das moléculas candidatas de modo a potencializar a sua eficácia atendendo aos parâmetros farmacocinéticos observados (Elebring, 2012).

Antes de se iniciar os ensaios toxicológicos pré-clínicos realiza-se a seleção da molécula candidata a novo fármaco através de uma série de testes e respetiva caracterização dos dados obtidos. A sequência de ensaios realizados integra uma bateria de testes em células, órgãos, tecidos e animais com a finalidade de selecionar a molécula que melhor se adapta ao objetivo terapêutico para o qual foi desenhada tendo em consideração o seu mecanismo de ação e a sua seletividade para os recetores alvo (Nasciutti, 2012).

Em seguida, o composto candidato é submetido aos ensaios toxicológicos pré-clínicos onde se identificam os perigos e se avalia o risco. A identificação dos perigos abarca o grau de severidade do novo composto no organismo bem como o potencial de reversibilidade ou irreversibilidade, ou seja, determina o tipo e o grau de toxicidade, estabelece a relação dose-resposta, fornece informação sobre a função da nova entidade química (NCE) no órgão alvo e, na maioria das vezes, o modo de toxicidade. Finda a identificação dos perigos e a avaliação do risco, inicia-se a extrapolação dos dados para o ser humano (Denny e Stewart, 2013).

Apesar do grande investimento feito pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos, a taxa de lançamento de novos produtos não se verifica na mesma proporção uma vez que 99,9% dos compostos candidatos revelam-se obsoletos antes de iniciar os ensaios clínicos, quer seja por exibirem toxicidade ou falta de eficácia (Dorato e Vodcnik, 2001).

Capítulo III - Bateria de ensaios para avaliação da toxicidade e/ou segurança de compostos

O desenvolvimento de novos fármacos implica que seja realizada uma bateria de estudos toxicológicos pré-clínicos no sentido de se obter informações que certifiquem a segurança dos novos compostos nos ensaios clínicos e, posteriormente, na sua comercialização (Faqi, 2013).

Estes estudos são requeridos pelas agências reguladoras sendo o ponto de partida para o desenvolvimento de um potencial fármaco e seguem critérios específicos que diferem conforme a região. Existem três regiões: a americana cuja entidade reguladora é a *Food and Drug Administration* (FDA), a europeia cuja entidade reguladora é a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e a asiática cuja entidade reguladora é a Agência Japonesa de Medicamentos e Dispositivos Médicos (PMDA) (Denny e Stewart, 2013).

A FDA é uma agência que pertence ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA e subdivide-se em quatro direções: o Departamento de Alimentação e Uso Veterinário, o Departamento do Tabaco e Dispositivos Médicos, o Departamento das Normas Orientadoras e o Departamento de Vigilância (FDA, 2014).

É responsável por proteger a saúde pública, através da regulamentação dos medicamentos de uso humano e fornece ao público a informação necessária, exata e com base científica, certificando-se da segurança, eficácia e qualidade de medicamentos, vacinas, produtos biológicos e dispositivos médicos. As funções atribuídas a esta agência são cumpridas pelos 50 estados dos EUA, pelo Distrito da Columbia, por Porto Rico, pelas Ilhas Virgens, entre outros territórios e propriedades dos EUA. Para além de estipular as normas que atestem a segurança dos medicamentos na região americana, esta agência encontra-se permanentemente em negociações internacionais com o Japão e a União Europeia (UE) para harmonizar diretrizes, com vista à obtenção da qualidade dos medicamentos e obtenção de dados necessários para aprovar um novo medicamento (Gouveia, 2013).

A EMA localiza-se em Londres e é responsável pela avaliação científica dos medicamentos tendo como atribuição principal a proteção e a promoção da saúde

pública e animal através da avaliação e supervisão dos medicamentos para uso humano e veterinário. Entre as numerosas funções que lhe são atribuídas, é de salientar a monitorização da segurança dos medicamentos de forma constante pela agência através de uma rede de farmacovigilância, o papel que assume na promoção da inovação e da investigação na indústria farmacêutica, a elaboração de diretrizes, o estabelecimento de padrões e a contribuição para as atividades de cooperação internacional, com as autoridades fora do espaço europeu entre as quais se destacam a Organização Mundial da Saúde, as conferências trilaterais (UE, Japão e EUA), a ICH e a Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (VICH). Todas as decisões e normas adotadas são válidas para a Europa e qualquer empresa desta região só pode começar a comercializar um medicamento, após a autorização de comercialização por esta agência. O Conselho de Administração da EMA é composto por 35 membros representantes dos Estados Membros, pela Comissão Europeia, pelo Parlamento Europeu e pelos representantes dos profissionais de saúde e doentes. Em Portugal, o Conselho de Administração da EMA é representado pelo Infarmed para os medicamentos de uso humano e pela Direção Geral de Veterinária para os medicamentos de uso veterinário (Infarmed, 2010).

A PMDA age em três dinâmicas distintas que subdividem-se a nível nacional e internacional. A nível nacional atua com elevados níveis de rigor nos seguintes aspetos: define as normas para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos na região asiática, assegura que os fármacos são introduzidos no mercado sobre elevados níveis de segurança, eficácia e qualidade e procura o desenvolvimento de novos métodos que permitam a entrada de fármacos eficazes e seguros num menor período de tempo. No que se refere ao papel da PMDA a nível internacional, esta agência estabelece parcerias com o Oriente no sentido de melhorar as diretrizes que definem a entrada do novo fármaco na região asiática e participa ativamente como membro asiático na ICH divulgando ideias e ajudando a implementar novas normas que visem a segurança do ser humano (PMDA, 2011).

Antes de surgir a Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos de Uso Humano (ICH), no início da década de 90, os estudos toxicológicos pré-clínicos seguiam as normas de cada região de acordo com as “Boas Práticas de Laboratório

(GLP)” fazendo com que a comercialização de um novo fármaco fosse um processo demasiado moroso (Denny e Stewart, 2013).

Em 2009, as diferentes regiões envolvidas no desenvolvimento de novos fármacos tornaram os testes toxicológicos pré-clínicos harmonizados através da criação de um compêndio designado de “Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2)” que reúne as normas orientadoras e serve de ferramenta para definir os ensaios toxicológicos pré-clínicos através da ICH, reduzindo assim as diferenças entre as regiões, embora as normas para o registo e aprovação de um novo produto farmacêutico difiram de país para país uma vez que ficam a cargo do patrocinador responsável pela introdução no mercado do novo fármaco (Denny e Stewart, 2013; ICH, 2009).

A harmonização do regulamento inerente aos ensaios toxicológicos pré-clínicos estabelecida pela ICH age no sentido de se alcançar uma maior harmonização na interpretação e aplicação das diretrizes e requisitos técnicos para registo de produtos farmacêuticos, reduzindo ou eliminando a duplicação de testes realizados durante a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para uso humano (Denny e Stewart, 2013).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos incluem estudos para avaliação de toxicidade geral (por dose única e repetida), genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade sobre a função reprodutora. Além destes, podem ser efetuados ensaios toxicológicos complementares, tais como os ensaios de tolerância local, sempre que a via de administração e/ou efeito produzido pelo novo fármaco o exija. Este conjunto de ensaios tem como objectivo subjacente avaliar a segurança através da caracterização dos efeitos tóxicos nos órgãos-alvo, da relação dose-resposta e, quando adequado, da reversibilidade de determinado efeito. A informação recolhida durante a realização destes ensaios serve para averiguar a dose inicial a administrar, o intervalo terapêutico a utilizar durante os ensaios clínicos e os potenciais efeitos adversos que poderão ocorrer, visto que cada ensaio apesar de estar confinado a determinados parâmetros encontra-se rigorosamente delineado para caracterizar os potenciais efeitos adversos que possam surgir nos ensaios clínicos (Nugent, Duncan e Colagiovanni, 2013).

A escolha dos métodos utilizados nos ensaios toxicológicos pré-clínicos é realizada em função da informação toxicológica e da relevância que os dados obtidos possuem no conhecimento das propriedades toxicológicas do composto em estudo (EMA, 2007).

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens das espécies utilizadas nos ensaios pré-clínicos (adaptado de Denny e Stewart, 2013)

Espécie	Vantagens	Desvantagens
Camundongo / Rato	Tamanho reduzido diminui o custo dos testes Fácil de manusear Múltiplas vias de administração Vários modelos disponíveis Fácil reprodução	Menor volume de sangue Requer o uso de coortes para avaliar os parâmetros toxicocinéticos
Cão (raça Beagle)	Fácil de manusear Múltiplas vias de administração Fácil reprodução	Grandes dimensões aumentam o custo dos testes Propenso ao vômito
Macaco	Múltiplas vias de administração Elevado grau de semelhança com o ser humano	Requer técnicas especiais de manuseamento
Porco	Modelo mais relevante para os testes dermatológicos Possibilidade de administração por via oral	Grandes dimensões aumentam o custo dos testes Requer técnicas de manuseamento especiais
Coelho	A sensibilidade na derme é muito maior que no homem	Propenso ao stresse, que muitas vezes é responsável pela sua morte

O processo de seleção das espécies é efetuado em função das semelhanças existentes entre os humanos e os modelos animais, em termos de morfologia, fisiologia e bioquímica assegurando assim uma extrapolação fiável dos resultados obtidos nos ensaios toxicológicos pré-clínicos para os clínicos. Contudo, é importante salientar que a extrapolação dos dados obtidos em modelos animais para o homem não é linear e, por isso, são utilizadas duas espécies distintas, uma de roedor e outra de não roedor, obtendo-se assim informações sobre as semelhanças e diferenças em termos

farmacocinéticos, o que permite obter resultados preditivos da segurança do novo fármaco mais fiáveis (Denny e Stewart, 2013; Morton, 1998).

A escolha do modelo animal para os ensaios toxicológicos geralmente recai sobre as espécies que estão indicadas na Tabela 1, atendendo às vantagens e desvantagens que cada uma apresenta (Denny e Stewart, 2013).

No que se refere às condições experimentais, os animais devem apresentar-se saudáveis, de origem conhecida, com semelhanças em termos de peso e idade e as condições ambientais devem ser controladas. Durante a fase de acondicionamento dos animais há um controlo rigoroso das condições ambientais (temperatura, humidade, tamanho da gaiola) bem como da dieta dos animais de modo a proporcionar o correto funcionamento do metabolismo e a longevidade dos animais (Denny e Stewart, 2013).

Relativamente ao número de animais usados nos testes *in vivo*, a decisão recai na maioria das vezes na determinação de parâmetros que definam alterações dos valores de referência em órgãos alvo (por exemplo, o aumento da atividade das enzimas hepáticas em 10% após a administração do novo composto). O número de animais por cada ensaio de toxicidade é definido de acordo com os parâmetros a averiguar, de modo a garantir a validade estatística do estudo em questão (Denny e Stewart, 2013).

O processo de seleção das doses para os ensaios toxicológicos pré-clínicos está relacionado com os dados obtidos nos testes *in vitro* mediante as curvas dose-resposta onde se determinam cinco parâmetros: a dose máxima tolerada (MTD), a dose máxima possível (MFD), a dose letal 50 (LD₅₀), a dose responsável pela saturação do órgão alvo e a dose limiar (Denny e Stewart, 2013).

A escolha da via de administração é mais simples do que das doses a administrar, sendo as vias mais comuns a oral, parentérica e a dérmica e, normalmente, recorre-se a mais do que uma via para a uma nova entidade consoante as vantagens e as desvantagens que estas oferecem (Tabela 2) (Denny e Stewart, 2013).

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens das diferentes vias de administração (adaptado de Denny e Stewart, 2013) Abreviaturas: PO-oral, IV-intravenosa, SC-subcutânea; IM-intramuscular

Via de administração	Vantagens	Desvantagens
PO (intubação gástrica)	Fácil de usar em todas as espécies Possibilidade de utilizar vários veículos Bem tolerável em ensaios de toxicidade aguda e crónica	Limitações na biodisponibilidade
PO	Muito utilizada em espécies caninas Bem tolerável no período de adaptação	Limitações na biodisponibilidade
IV	Fácil de usar em todas espécies Obtém-se uma biodisponibilidade de 100%	Requer a administração de formulações esterilizadas
SC	Fácil de usar em todas as espécies Apresenta uma elevada biodisponibilidade	Requer a administração de formulações esterilizadas Depende da tolerância local
IM	Fácil de usar em todas as espécies Apresenta uma elevada biodisponibilidade	Requer a administração de formulações esterilizadas O volume de injetável administrado é limitado Depende da tolerância local

3.1 Ensaio de toxicidade por dose única

Até junho de 2008, a primeira etapa de avaliação de segurança de um novo composto era o ensaio de toxicidade por dose única (aguda) que correspondia ao teste *in vivo* mais elementar dos ensaios toxicológicos pré-clínicos onde se administrava uma dose ou doses fracionadas por um período de 24 horas com a finalidade de recolher os seguintes dados: a dose letal 50 (DL₅₀) ou concentração letal 50 (CL₅₀) sempre que aplicável e os sinais de toxicidade e da causa de morte (EMA, 2010a).

Este estudo era efetuado em duas espécies de mamíferos, de ambos os sexos, constituindo grupos padronizados, embora o número de animais utilizados por grupo estivesse dependente da via utilizada. As duas vias de administração selecionadas compreendiam a via pretendida para a administração em humanos (oral, dérmica, ocular ou inalatória) e a via parentérica e a dose usada era de 1000 mg/kg/dia (EMA, 2010a).

O período de observação deste estudo era de 14 dias a contar do dia de administração do composto, sendo que no próprio dia da administração os animais eram observados no mínimo duas vezes e nos restantes dias pelo menos uma vez o que permitia um registo diário das alterações do peso corporal, da quantidade de alimentos ingeridos e do comportamento (EMA, 2010a).

Tal como foi mencionado anteriormente, este teste foi abolido devido ao facto da informação obtida neste ensaio ser obtida noutros ensaios de toxicidade. Contudo é importante salientar que existem situações concretas em que este ensaio é a única forma de sustentar dados que garantam a segurança dos testes em humanos como acontece com os medicamentos oncológicos (EMA, 2010a).

3.2 Ensaio de toxicocinética

A toxicocinética é a ciência que avalia a disposição do fármaco ao longo do organismo através dos dados farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e eliminação) e é aplicada nos diversos ensaios toxicológicos pré-clínicos (Baldrick, 2003; Bessems e Geraets, 2013; 1998; Ekins *et al.*, 2000; Horii, 1998).

O ensaio de toxicocinética não tem um período de tempo definido e, por isso, tem uma duração que permita recolher todos os dados farmacocinéticos. O seu principal objetivo é a descrição da exposição sistémica em modelos animais e a sua relação com a dose e o tempo. Como objetivos secundários citam-se: avaliar a relevância que a informação obtida terá na segurança dos ensaios clínicos e recolher informação que suporte o desenho dos ensaios pré-clínicos, bem como a escolha das espécies e regimes de tratamento (ICH, 1994).

Nas últimas duas décadas, vários programas foram desenvolvidos de acordo com o conhecimento científico e as novas tecnologias com o intuito de fornecer os dados iniciais de segurança e eficácia de um novo fármaco visto que a integração dos estudos toxicocinéticos numa fase inicial de exploração de novas moléculas funciona como elemento chave que possibilita a escolha das espécies mais adequadas e um desenho eficaz dos estudos pré-clínicos a partir do qual se estabelece a relação da exposição ao novo fármaco entre os dois contextos e as margens de segurança para os ensaios clínicos (Baldrick, 2003; Renwick, 2000).

A informação proveniente dos estudos toxicocinéticos é fundamental para os estudos toxicológicos pré-clínicos uma vez que perante os dados recolhidos da acumulação das doses nos tecidos, a saturação dos recetores envolvidos na absorção, a saturação das vias de destoxificação, bem como a formação de metabolitos reativos, é possível fazer uma triagem dos compostos candidatos (Renwick, 2000).

O conhecimento das concentrações plasmáticas do fármaco no organismo permite determinar a frequência de administração do fármaco e a posologia, selecionar a espécie animal mais adequada para os ensaios toxicológicos pré-clínicos e extrapolar os efeitos toxicológicos obtidos em modelos animais para o homem (Renwick, 2000).

O estudo toxicocinético integra quatro fases de onde se extrai os parâmetros de biodisponibilidade, tempo de semi-vida e volume de distribuição e se estabelece a concentração plasmática e a área sobre a curva (ICH, 1994).

Para avaliar o processo de absorção que compreende desde o momento de administração do fármaco até que este entre na circulação sistémica analisa-se a composição do sangue em função do tempo até ao aparecimento da substância ativa no sangue, determinando-se assim através deste fluido biológico a quantidade de substância que atinge a corrente sanguínea bem como a velocidade de absorção do fármaco (ICH 1994; Renwick, 2000; Timbrell, 2009).

A segunda etapa da toxicocinética é a distribuição onde ocorre a passagem do fármaco da corrente sanguínea para os tecidos ou órgãos alvo. No final do estudo procede-se a

técnicas de imagiologia para analisar os tecidos onde ocorre acumulação do fármaco e as proteínas plasmáticas que se ligam ao fármaco (ICH 1994; Renwick, 2000).

Na fase de metabolização, o fármaco sofre um conjunto de reações químicas (maioritariamente) a nível hepático envolvendo a formação de conjugados que o tornam mais hidrossolúvel e, conseqüentemente, mais facilmente excretado. Findo este estudo, submete-se alguns dos animais a necrópsia e determina-se a velocidade de metabolização, as enzimas envolvidas na metabolização da substância ativa, a caracterização dos metabolitos e a depleção de fatores de conjugação (por exemplo, a glutatona) (ICH 1994; Renwick, 2000).

A eliminação do fármaco ocorre principalmente por duas vias, a urinária e fecal, embora existam outras com uma menor expressão como acontece com a saliva, suor e leite materno. Perante os fluídos biológicos envolvidos na excreção do fármaco e respetivo metabolito faz-se o doseamento dos fluídos para averiguar a taxa de eliminação do fármaco (ICH, 1994; Renwick, 2000).

A aplicação da análise toxicocinética é feita em diversos ensaios toxicológicos pré-clínicos. O regime de tratamento e a seleção das espécies para os ensaios de toxicidade por dose repetida e de carcinogenicidade é feito com base nos dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Nos ensaios de genotoxicidade os resultados negativos são confirmados mediante os dados obtidos com a exposição sistémica da espécie ou dos tecidos utilizados nos ensaios de toxicocinética e nos ensaios de toxicidade na função reprodutora a seleção da dose e das espécies a utilizar é realizada tendo por base os dados obtidos no ensaio de toxicocinética (ICH, 1994).

Tal como é possível constatar, a aplicação dos conhecimentos toxicocinéticos nos ensaios toxicológicos pré-clínicos confere melhorias em termos de eficácia, relevância, fiabilidade e custo uma vez que reduz o número de testes pré-clínicos e a experimentação animal irrelevante e, ao mesmo tempo, ajuda a maximizar a segurança no homem (Bessemers e Geraets, 2013).

3.3 Ensaio de toxicidade por dose repetida

O ensaio toxicológico por dose repetida tem como finalidade caracterizar o perfil toxicológico do novo fármaco mediante a determinação do nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) e do nível mínimo com efeitos adversos observáveis (LOAEL). Além de definir a janela terapêutica, este ensaio permite identificar os órgãos alvo de toxicidade do novo fármaco, bem como os seus efeitos nos parâmetros fisiológicos, hematológicos, bioquímicos, anatómicos e histopatológicos nos modelos animais utilizados (EMA, 2010b).

A seleção do modelo animal recai sobre duas espécies distintas, uma de roedor e outra de não roedor, com elementos de ambos os sexos, que apresentem a maior semelhança em termos farmacocinéticos com o homem para que a extrapolação dos dados obtidos nos estudo pré-clínico para o contexto clínico seja o mais relevante possível. Não está estabelecido um número definido de animais a utilizar, embora o estudo deva apresentar um número suficientemente grande que permita o sacrifício de animais ao longo e no final do ensaio para a avaliação de parâmetros fisiológicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos (EMA, 2010b).

A posologia consiste na administração de 3 doses diferentes: uma dose baixa, com a finalidade de se observar os efeitos farmacodinâmicos e os efeitos terapêuticos desejáveis; uma dose intermédia para revelar os primeiros efeitos adversos; e uma dose elevada, que é geralmente de 1000 mg/kg/dia, capaz de induzir toxicidade no órgão alvo, bem como em outros órgãos, sem causar a morte do animal em estudo. Neste ensaio de toxicidade quando se incorpora o novo fármaco na dieta ou na bebida das espécies sujeitas ao ensaio, este tem de ser monitorizado ao longo do tempo para que a quantidade de fármaco presente nos alimentos ou na água seja ajustada em função das alterações do peso corporal e da ingestão de alimentos (EMA, 2010b).

A via de administração utilizada no ensaio é habitualmente a mesma que se pretende utilizar no homem, ainda que na impossibilidade de se utilizar a mesma via se recorra à via parenteral (EMA, 2010b).

A duração do ensaio de toxicidade por dose repetida é igual ou superior à duração do tratamento em humanos conforme consta nas normas orientadoras “Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorisation for Pharmaceuticals M3(R2)” (EMA , 2010b; ICH, 2009).

Durante o estudo são avaliados diversos parâmetros que incluem os fisiológicos, através da avaliação do comportamento, do peso corporal e do consumo de alimentos e de água; hematológicos; oftalmológicos; e bioquímicos, bem como a duração e reversibilidade da toxicidade (EMA, 2010b).

Quando o ensaio termina deve ser recolhido o máximo de informação e, para tal, o grupo de animais que recebeu a dose mais elevada é submetido a necrópsia para a recolha dos dados histopatológicos em tecidos e órgãos. Caso sejam identificadas alterações histopatológicas nos órgãos e/ou tecidos, os grupos com a dose intermédia e baixa são igualmente submetidos a necrópsia para se estabelecer uma relação entre a dose e a resposta obtida (EMA, 2010b).

A avaliação histopatológica pode ser conduzida em outros locais do corpo se a natureza do composto teste assim o exigir. Por exemplo, realiza-se o esfregaço da medula óssea quando são detetadas mudanças nos órgãos ou alterações no sangue periférico onde se contabiliza a distribuição e a morfologia das células ou analisa-se as células do sistema nervoso central e respetivas regiões quando o novo fármaco atua no SNC, prolongando-se o ensaio quando a molécula exibe neurotoxicidade. Nos estudos em que a via inalatória é a escolhida, o peso dos pulmões é determinado e todos os tecidos do trato respiratório são analisados ao microscópio e quando o composto em análise revela efeitos imunológicos observa-se microscopicamente o timo, o baço e os nódulos linfáticos (EMA, 2010b).

Todos os tecidos analisados são conservados em condições de temperatura e humidade adequados e a informação recolhida é registada e documentada de acordo com as normas pelo qual o estudo foi orientado (EMA, 2010b).

A duração dos ensaios de toxicidade por dose repetida tem uma duração equivalente à indicação terapêutica para o qual o novo fármaco foi desenhado no âmbito dos ensaios

clínicos, sendo este ensaio classificado de acordo com o período de duração: ensaio de toxicidade por dose sub-aguda (14 a 28 dias), ensaio de toxicidade por dose sub-crónica (90 dias) ou ensaio de toxicidade por dose crónica (6-12 meses) (Denny e Stewart, 2013; EMA, 2010b)

3.3.1 Ensaio de toxicidade por dose sub-aguda

O ensaio de toxicidade sub-aguda tem uma duração compreendida entre os 14 e os 28 dias. Cada grupo é composto por 20 animais de cada espécie (roedor e não roedor) devidamente agrupados por sexo e ao longo do ensaio observa-se diariamente as características dos animais, nomeadamente o aspeto do pêlo, dos olhos, das mucosas, a frequência respiratória e circulatória e as alterações no padrão de alimentação e no peso corporal. Findo o estudo submete-se os animais a necrópsia para a recolha dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e histopatológicos (OECD, 2008).

3.3.2 Ensaio de toxicidade por dose sub-crónica

O ensaio de toxicidade por dose sub-crónica tem uma duração de 90 dias e recorre à utilização de duas espécies distintas, pertencendo uma à categoria dos roedores (normalmente camundongos) e a outra à categoria dos não roedores. Cada grupo é constituído por 20 animais repartidos equitativamente por ambos os sexos (OECD, 2009).

Ao longo do estudo recolhe-se informação sobre o peso corporal, os padrões alimentares, o estado das mucosas e dos olhos e amostras de sangue para realizar as determinações bioquímicas e no final do ensaio procede-se à necrópsia dos tecidos e órgãos (OECD, 2009).

3.3.3 Ensaio de toxicidade por dose crónica

Os estudos de toxicidade por dose crónica diferem entre as três agências reguladoras quanto ao período de duração. A FDA (agência americana) e a PMDA (agência asiática) requerem que este ensaio de toxicidade tenha uma duração de 12 meses, enquanto a EMA (agência europeia) requer uma duração de 6 meses. Porém, a FDA reconhece que

9 meses são suficientes para extrair todos os parâmetros de toxicidade presentes no novo fármaco (Denny e Stewart, 2013; EMA, 1999).

O número de animais utilizados e os parâmetros avaliados são os mesmos que se encontram descritos para os ensaios de toxicidade por dose sub-crônica. A duração deste ensaio permite avaliar os efeitos adversos que ocorrem a curto e a médio prazo e abrange o período de tempo utilizado para a maioria dos produtos farmacêuticos. Um período de tempo mais alargado pode ser justificável para as moléculas que vão integrar tratamentos crônicos e para o estudo de produtos biofarmacêuticos em que os seus mecanismos de ação e de toxicidade ainda são desconhecidos (EMA, 1999).

3.4 Estudos de toxicidade na função reprodutora

Em outubro de 1957, a talidomida foi introduzida no mercado sob o nome comercial de Contergen® por uma companhia farmacêutica alemã como um fármaco pertencente à classe dos hipnóticos e sedativos e, portanto, foi prescrito a grávidas para tratamento dos enjoos matinais. Porém, anos mais tarde assistiu-se ao nascimento de crianças com focomelia que corresponde a malformações nos membros (Smithells e Newman, 1992; Stump *et al.*, 2013).

A comunidade científica foi alertada com este desastre para a necessidade de se introduzir nos ensaios pré-clínicos uma etapa onde se analisasse os efeitos de novos fármacos, aditivos, corantes e medicamentos de uso veterinário (destinados a animais que posteriormente venham a integrar a cadeia alimentar humana) sobre a função reprodutora e, em 1966, foram definidas as diretrizes que delineavam os ensaios de toxicidade na função reprodutora especificando três tipos: estudos de fertilidade, estudos de embriotoxicidade e teratogenicidade e estudos peri e pós-natal (Stump *et al.*, 2013).

A ICH definiu que o ciclo reprodutivo tem de ser estudado ao longo de 6 estádios de modo a proporcionar informação sobre os efeitos do novo fármaco e respetivos metabolitos (EMA, 1994):

- O estadio A abrange desde a fase de pré-acasalamento até ao momento da concepção, onde se analisam as funções do ciclo reprodutivo em ambos os sexos, o período de acasalamento e a etapa de fertilização onde se faz a deteção do espermatozóide via esfregaço vaginal;
- O estadio B compreende desde a concepção até à implantação do ovo no útero durante um período de 7 dias quando são seleccionadas como espécies os ratos, os camundongos e os hamsters e ao longo deste período de tempo avalia-se o sistema reprodutor feminino e o desenvolvimento do ovo até a sua implantação no útero;
- O estadio C abarca desde o momento da implantação embrionária até ao momento do fecho do palato duro, sendo observado o desenvolvimento do embrião e a formação dos primeiros órgãos, nomeadamente o coração;
- O estadio D inclui o desenvolvimento do feto até ao término da gravidez onde se regista o desenvolvimento fetal bem como o crescimento dos órgãos;
- O estadio E abrange o período de nascimento até ao desmame onde se avalia a função reprodutora da mãe e a adaptação do neonato à vida extra-uterina até este entrar no desmame;
- O estadio F que vai desde o momento do desmame até à maturação sexual onde se avalia o desenvolvimento e crescimento após o desmame, adaptação a uma vida independente e desenvolvimento da função sexual.

A escolha das espécies obedece a alguns parâmetros destacando-se a idade, o peso, a fertilidade, a fecundação, a prevalência de anormalidades, o número de embriões mortos e a consistência que os resultados oferecem quando extrapolados para o ser humano. Mediante estes parâmetros escolhem-se os modelos relevantes atendendo às limitações que apresentam (tabela 3), optando sempre que possível por espécies em que não são necessários procedimentos preliminares para reduzir os recursos envolvidos (Stump *et al.*, 2013).

Tabela 3 – Limitações das diferentes espécies nos estudos de toxicidade para a avaliação da função reprodutiva (adaptado de EMA, 1994)

Espécie	Limitações
Rato	Inadequado para os agonistas da dopamina devido à dependência da prolactina para a manutenção da gravidez Muito suscetível aos anti-inflamatórios não esteróides no final da gravidez Sensibilidade às hormonas sexuais
Camundongo	Elevada taxa metabólica Existência de aglomerados de malformações Feto pequeno
Coelho	Difícil recolher dados toxicológicos Presença de distúrbios no TGI Sensíveis a algumas classes de antibióticos
Porquinho da Índia	Longo período fetal Presença de distúrbios no TGI Sensíveis aos antibióticos
Mini porcos	Exige a administração de grande quantidade de novo fármaco Existência de aglomerados de malformações Necessário uma gaiola de grandes dimensões para o seu acondicionamento
Hamster	A dose do fármaco administrada pode ficar retida nas bochechas Dificuldade na utilização da via intravenosa Elevada sensibilidade no TGI Exibe uma resposta teratogénica excessiva Feto pequeno
Cão	Fatores de endogamia Reprodução sazonal

A seleção da dose é uma das decisões mais importantes neste ensaio e inicia-se a escolha da dose mais elevada de acordo com os seguintes fatores: o aumento do peso devido a perturbações nos mecanismos de homeostasia; o órgão alvo de toxicidade; os parâmetros hematológicos, os efeitos adversos provenientes de uma resposta farmacológica exagerada, as propriedades físico-químicas do novo fármaco, a via de administração e a quantidade do novo composto responsável pela mortalidade dos fetos e embriões. Após a determinação da dose mais elevada efetua-se uma sequência de intervalos terapêuticos até se estabelecer o NOAEL (EMA, 1994).

Geralmente a via de administração é a mesma que se pretende utilizar nos ensaios clínicos e, na impossibilidade, recorre-se à via de administração que sustente um perfil de distribuição similar com uma frequência de administração diária, salvo alguma exceção que exija o aumento ou a diminuição da administração (EMA, 1994).

3.4.1 Estudos de fertilidade

Através dos estudos de fertilidade verifica-se os efeitos tóxicos decorrentes da administração do novo fármaco antes do acasalamento, durante o acasalamento e os estadios subjacentes até ao momento da implantação do embrião no útero. Nos indivíduos do sexo feminino avalia-se os efeitos no ciclo menstrual, o transporte do óvulo para as trompas de falópio e a implantação do embrião no útero, enquanto que nos indivíduos do sexo masculino é avaliado o efeito que o novo fármaco tem na libido e na maturação dos espermatozóides no epidídimo (EMA, 1994).

Normalmente usa-se apenas uma espécie (geralmente o rato) e o tamanho do grupo é definido em função dos parâmetros que se pretende analisar. Após a obtenção dos resultados do processo de espermatogénese ao longo de um mês, normalmente provenientes dos ensaios de toxicidade por dose repetida e na ausência de quaisquer efeitos tóxicos, iniciam-se os estudos de fertilidade onde se observa a fase anterior ao acasalamento durante um período de 4 semanas para os indivíduos do sexo masculino e de 2 semanas para os indivíduos do sexo feminino, seguindo-se a análise da fase de acasalamento e o estudo prossegue até ao momento em que ocorre a implantação do ovo no útero (EMA, 1994).

Ao longo do ensaio de fertilidade são registadas as alterações morfológicas, o peso corporal, o padrão alimentar e os resultados do esfregaço da mucosa vaginal. No término do estudo submete-se os animais à necrópsia com o intuito de avaliar os órgãos sexuais através de exames histológicos e contar os espermatozóides viáveis nos indivíduos do sexo masculino e os corpos lúteos nos indivíduos do sexo feminino (EMA, 1994).

3.4.2 Estudos de embriotoxicidade e teratogenicidade

Esta etapa tem como finalidade detetar os efeitos adversos do novo composto na grávida e no desenvolvimento do embrião e do feto. Este estudo comporta dois grupos de espécies, geralmente uma espécie de roedor (rato) e uma espécie de não roedor (coelho), sendo o tamanho dos grupos estabelecido de acordo com os parâmetros a analisar (EMA, 1994).

No decurso do estudo são registados os seguintes parâmetros: as alterações morfológicas, a evolução do peso corporal, a ingestão de alimentos e o número de mortes ocorridas. Findo o estudo procede-se ao sacrifício das fêmeas antes do término da sua gravidez para analisar o aparelho reprodutor da grávida, a evolução da placenta, o peso do feto e a existência de anormalidades através de métodos capazes de avaliar em simultâneo os tecidos moles e o tecido esquelético, como é o caso da microdissecação (EMA, 1994).

3.4.3 Estudos peri e pós-natal

Nos estudos peri e pós-natal obtém-se informação sobre os efeitos adversos que ocorrem durante a gravidez, a lactação e no recém-nascido e, na presença de efeitos adversos, o estudo é prolongado até o novo ser atingir a maturidade sexual (EMA, 1994).

É empregue uma espécie (geralmente o rato) para avaliar a toxicidade e o estudo é acompanhado desde do momento da implantação do embrião no útero até o novo ser entrar na fase de desmame sendo analisadas as alterações morfológicas, o peso corporal,

as alterações no padrão alimentar, o tempo de gestação e as características do parto (EMA, 1994).

No final do ensaio é contabilizado o número de animais vivos e mortos após o parto e, posteriormente, as fêmeas são submetidas a necrópsia. Relativamente aos animais que sobreviveram regista-se o peso, a presença de anormalidades, o desenvolvimento físico e psicológico, o comportamento e a maturação dos órgãos sexuais (EMA, 1994).

3.5 Ensaio de genotoxicidade

Os ensaios de genotoxicidade conferem informação sobre a capacidade do novo fármaco induzir mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) levando a alterações nos cromossomas. Porém, a capacidade de um composto desencadear danos nos genes nem sempre é evidente porque o cancro envolve um processo complexo que se expressa passados anos, sendo necessários estudos de carcinogenicidade que são de longa duração e dispendiosos (Kirkland *et al.*, 2011; Nicolette, 2013).

Contudo, sabe-se que todos os processos de carcinogenicidade afetam diretamente o ADN conduzindo a mutações que vão progredindo ao longo do tempo e manifestam-se sobre a forma de tumores. Alterações na estrutura do ADN são detetáveis por ensaios de genotoxicidade e mediante os resultados é possível prever se o novo fármaco numa etapa inicial do seu desenvolvimento poderá levar no futuro ao aparecimento de tumores (Friedrichi e Olejniczak, 2011; Vanparys *et al.*, 2012).

Os testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* são ensaios de curta duração, acessíveis do ponto de vista económico e constituem uma forma eficaz de determinar se o novo composto tem capacidade para interagir com o ADN, causar mutações, provocar danos nos cromossomas ou afetar a capacidade de reparação do ADN, conferindo assim todos os indicadores de carcinogenicidade (Sawant, Fielden e Black, 2014).

A simplicidade deste ensaio proporciona o desenvolvimento de várias versões de testes *in vitro* e *in vivo* para a deteção do potencial genotóxico do novo fármaco, ajudando desta forma as indústrias farmacêuticas a selecionar o potencial candidato sem colocar em risco a vida do ser humano (McCann e Ames, 1976; Thybaud *et al.*, 2011).

Tal como já foi mencionado anteriormente, a avaliação da carcinogenicidade numa fase inicial do desenvolvimento de novos fármacos é muito dispendiosa e morosa e, por isso, recorre-se a uma bateria de testes de genotoxicidade que pode seguir duas opções. Uma das opções integra os seguintes testes: (i) um teste de mutação genética em bactérias; (ii) um teste citogenético para avaliação de dano cromossómico (teste de aberração cromossómica ou teste de micronúcleo *in vitro*) ou um teste *in vitro* de mutação genética em células de linfoma de rato e (iii) um teste *in vivo* para genotoxicidade, usualmente um teste de dano cromossómico em células hematopoiéticas de roedores (onde se deteta micronúcleos ou aberrações cromossómicas). A segunda opção inclui (i) um teste de mutação genética em bactérias e (ii) um teste para avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo em células hematopoiéticas de rato e um segundo ensaio *in vivo* (ICH, 2011).

O teste de mutação em bactérias é designado de teste de Ames. É muito económico e acessível, por não envolver equipamento complicado. Faz-se em várias estirpes de bactérias, sendo a mais comum a *Salmonella typhimurium*. As estirpes usadas são modificadas no código genético, de modo a tornarem-se dependentes da histidina (*his-*). Quando o composto em estudo é incluído no meio de cultura, caso não induza alterações no ADN, o número de colónias permanece intacto uma vez que a bactéria não consegue obter o aminoácido histidina por via exógena. Porém, se o fármaco induzir mutação no material genético da bactéria, esta torna-se capaz de se desenvolver na ausência de histidina (o genótipo *his-* foi revertido a *his+*) sendo visível a multiplicação das colónias (mutantes) num período de 48 a 72 horas. Outro ensaio que pode ser feito paralelamente é a ativação metabólica: adiciona-se a fração S₉ preparada a partir de fígado de rato induzido (contém as enzimas microssomais necessárias à metabolização do composto), visto que a substância em estudo pode não ser mutagénica por si, mas só após a metabolização (EMA, 2012; Gatehouse *et al.*, 1994; Nicolette, 2013).

Além desta estirpe, também se recorre frequentemente a estirpes de *Escherichia coli*. Quando se está perante compostos que são extremamente tóxicos para serem utilizados no estudo como é o caso da azida sódica, o 2-nitrofluoreno, a 9-aminoacridina e o 2-aminoantraceno para a bactéria *Salmonella typhimurium* e o óxido de 4-nitroquinolina, sulfonato de metilmetano e o 2-aminoantraceno para a bactéria *Escherichia coli* deve-se

utilizar outras estirpes (EMA, 2012; Gatehouse *et al.*, 1994; Mortelmans e Zeiger, 2000; Nicolette, 2013).

O teste citogenético consiste na observação microscópica de cada cromossoma durante a mitose e emprega linhas celulares de hamsters, quando se trata da avaliação da segurança nos ensaios pré-clínicos, e linfócitos quando se está perante os ensaios clínicos. O parâmetro usado neste ensaio indicativo de potencial genotóxico é a elevação do índice mitótico. Nas culturas celulares que compreendem o grupo teste adiciona-se o fármaco em estudo quando as células se encontram na fase de crescimento, ao grupo controlo adiciona-se fenobarbital e duas horas antes de utilizar as culturas adiciona-se um composto inibidor da mitose como a colchicina. No entanto, é importante salientar que existem outros métodos disponíveis para a determinação do índice mitótico como a citometria de fluxo que oferece uma maior consistência de resultados uma vez que estes não estão dependentes do grau de citotoxicidade (o que é importante pois o excesso de citotoxicidade leva ao aparecimento de danos nos cromossomas) (EMA, 2012).

O teste de micronúcleo identifica também a presença de danos nos cromossomas visto que a existência de micronúcleos é usada como uma ferramenta para a determinação da extensão de mutações que o novo fármaco provoca nas células. O micronúcleo é um núcleo adicional separado do núcleo principal da célula formado por cromossomas ou fragmentos destes que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose. Possui as seguintes características: a estrutura da cromatina em termos de cor e intensidade é similar à do núcleo principal, tem uma borda evidente, um formato arredondado, apresenta uma localização intercitoplasmática e o diâmetro é no mínimo inferior a um quinto do núcleo principal. Embora os mecanismos de reparação do ADN sejam eficazes, a sensibilidade da estrutura cromossómica permite a interferência de agentes clastogénicos que provocam a quebra dos cromossomas e de agentes aneugénicos que intervêm no fuso mitótico o que leva a aberrações cromossómicas que podem ter como consequência o aparecimento de neoplasias quando estes agentes atuam a nível das células somáticas. No final dos testes faz-se a contagem de dois tipos de células, isto é, das células mononucleadas e das células binucleadas e mediante a razão entre os dois tipos de células acede-se ao índice de proliferação celular comprovando-se assim se o novo composto exhibe mutagenicidade (EMA, 2012).

O teste de aberração cromossômica é muito semelhante ao teste do micronúcleo e baseia-se na visualização microscópica de células da medula óssea de ratos e camundongos após a administração do novo composto em períodos de tempo definidos. Três a cinco horas antes da colheita das células administra-se um composto inibidor da proliferação (como a colchicina) e no momento de coloração do esfregaço adiciona-se corante de Giemsa e analisa-se os seguintes parâmetros: número total de células com aberrações, o número de cada tipo de aberrações e a frequência com que aparecem as aberrações nas células (EMA, 2012).

A análise *in vivo* de genotoxicidade consiste na exposição do fígado ao novo fármaco durante um determinado período de tempo, sendo este órgão perfundido e os hepatócitos isolados em culturas que possuem tiamina tritiada durante um período de 7 a 14 dias ao abrigo da luz. Ao fim deste tempo de incubação prepara-se os esfregaços e analisa-se o número de grânulos nos hepatócitos da cultura teste e controlo. Se o número de grânulos nos hepatócitos que pertencem à cultura teste for superior, este resultado indica que o novo fármaco é indutor de lesões uma vez que o aumento do número de grânulos advém dos mecanismos de reparação de ADN (EMA, 2012; Muller-Tegethoff *et al.*, 1997).

Os ensaios de genotoxicidade são uma mais valia na determinação do potencial mutagénico que o novo composto poderá apresentar no ser humano. Contudo é importante salientar que este ensaio apresenta várias limitações entre as quais se destacam: para avaliar as aberrações cromossômicas é necessário que as células se encontrem em metáfase; a presença de mutações nem sempre é sinónimo de desenvolvimento de um cancro; os compostos que não sofrem absorção não podem ser usados nos testes *in vivo* e não é possível realizar o teste de Ames quando se analisa compostos tóxicos para as estirpes de bactérias empregues neste teste (EMA, 2012).

É ainda de referir que aquando da interpretação dos resultados dos testes *in vitro* se deve ter em conta os falsos positivos que podem advir de condições que não se constataem *in vivo*, tais como o pH, a osmolalidade e a formação de precipitados. Além disso, a reduzida taxa de viabilidade das células de mamíferos pode advir de contaminações e os falsos negativos podem ter origem na escolha errónea da via metabólica ou do teste selecionado para o composto em questão. Relativamente aos testes *in vivo* também se

verificam falsos positivos porque o aumento do número de micronúcleos pode ocorrer sem administração de qualquer fármaco devido as distúrbios na eritropoiese e durante a manipulação do material genético podem ocorrer danos no ADN que não resultam da exposição ao novo fármaco (EMA, 2012).

3.6 Ensaio de carcinogenicidade

A avaliação do potencial carcinogénico de novos fármacos é realizada durante um período de 24 meses, onde se determina a capacidade do composto para induzir o aparecimento de tumores. Envolve a administração do novo fármaco por longos períodos de tempo em espécies roedoras de ambos os sexos, que são submetidas a exames histológicos com a finalidade de identificar a formação de neoplasias benignas e malignas provenientes da exposição prolongada ao composto em estudo (Friedrichi e Olejniczak, 2011; Hulf, 1992).

Os estudos de carcinogenicidade iniciam-se o mais rapidamente possível após o término do desmame e a integração na alimentação do modelo animal, sob condições ambientais perfeitamente controladas como a humidade, os ciclos circadianos e a alimentação (EMA, 2002).

Como os ensaios de carcinogenicidade são dispendiosos e morosos, estes são efetuados apenas nas seguintes situações: quando os ensaios de genotoxicidade indicam que o novo fármaco tem potencial mutagénico, o novo composto insere-se numa classe de fármacos que revela carcinogenicidade, o novo fármaco destina-se a tratamentos crónicos superiores a seis meses, a relação estrutura-atividade evidencia potencial carcinogénico ou há a retenção do novo fármaco e/ou respetivos metabolitos em tecidos e órgãos que foram alvo de alterações fisiopatológicas (Marone, Hall e Hayes, 2014).

No entanto, existem algumas situações em que a bateria de ensaios toxicológicos pré-clínicos não requisita o ensaio de carcinogenicidade, como quando se verifica que o fármaco se destina a uma população cujos anos de vida previstos são muito reduzidos, quando o fármaco não sofre absorção sistémica ou quando o período de exposição é muito curto como se constata com os agentes de contraste (McCormick, 2013).

A seleção dos modelos animais baseia-se na capacidade metabólica das espécies para sustentar os resultados de carcinogenicidade no contexto clínico, sendo normalmente utilizados roedores (ratos e camundongos) (EMA, 2002).

Vários parâmetros definem as doses a usar nestes ensaios, entre os quais a toxicidade, a farmacocinética, a farmacodinâmica, a comparação da área sob curva no modelo animal e no homem, a saturação dos recetores, a dose máxima tolerável e a dose terapêutica. Geralmente são estudadas três doses distintas: uma dose alta responsável pela indução dos efeitos adversos sem que estes causem a morte prematura dos animais ou conduzam a alterações de peso que resultem em processo de imunossupressão mascarando os processos complexos envolvidos na formação de tumores; uma dose intermédia e uma dose baixa onde se constata uma toxicidade muito limitada (EMA, 2002).

Após a determinação das doses normalmente constituem-se cinco grupos tendo cada grupo 100 animais igualmente distribuídos por sexo, onde três grupos constituem os grupos teste que são submetidos às diferentes doses e dois constituem os grupos controlo que são tratados apenas com o veículo onde se incorpora o novo fármaco. A existência de dois grupos controlo serve para que um deles seja submetido a necrópsia e se efetue a avaliação histopatológica e o outro grupo embora seja submetido à necrópsia os seus órgãos e tecidos são previamente processados para serem posteriormente analisados, garantindo assim que a existência tumores tem uma relação dose-resposta e não a envolvimento de fatores externos (EMA, 2002).

A avaliação carcinogénica engloba os seguintes parâmetros: a taxa de mortalidade e morbidade, os efeitos adversos ocorridos após uma hora da administração das doses, as alterações do peso corporal, do padrão de consumo de alimentos, dos parâmetros hematológicos, o aparecimento de patologias e a modificação dos processos de metabolização e excreção (EMA, 2002).

Ao fim de 24 meses todos os grupos são alvo de análise macroscópica para a deteção de possíveis lesões e, de seguida, os grupos controlo e da dose mais alta são submetidos a necrópsia para a análise histopatológica dos órgãos e tecidos. Caso sejam encontradas lesões indiciadoras de carcinogenicidade, os grupos em que foram administradas as

doses intermédia e baixa são igualmente sacrificados com a finalidade de se estabelecer a DT_{50} (EMA, 2002).

3.7 Ensaio de imunotoxicidade

Este estudo tem uma duração de 28 dias e tem como objetivo descrever a atividade imunomoduladora que compreende a imunossupressão que se caracteriza por uma diminuição da resposta imune o que leva a um decréscimo da capacidade do hospedeiro em resistir a agentes infecciosos e a combater as células tumorais ou por um aumento da resposta imune que resulta em estadios de hipersensibilidade e em respostas alérgicas devido a uma ativação exagerada do sistema imunitário (Farmer e Dietert, 2013; ICH, 2008; Schulte e Ruetil-Fehlert, 2006; Snodin, 2004).

As espécies mais utilizadas são o rato, o camundongo e o cão. São administradas várias doses pela mesma via que se pretende utilizar no homem, sendo a mais elevada a correspondente ao NOAEL com a finalidade de determinar a relação existente entre a dose e o efeito imunológico observado (EMA, 2006; ICH, 2008).

No momento de se avaliar o potencial imunotóxico deve-se ter em consideração o mecanismo de ação do fármaco, as diferenças entre as espécies, as respostas fisiológicas ao stresse, a população alvo do tratamento, as semelhanças estruturais entre o fármaco e os imunomoduladores e a distribuição do fármaco no organismo porque todos estes fatores interferem com o sistema imunológico (EMA, 2006).

Ao longo deste ensaio regista-se a evolução dos seguintes parâmetros: a incidência de infeções por microrganismos comensais, a alteração do número de leucócitos na ausência de patologias e a razão albumina/globulina (EMA, 2006).

Tem-se estabelecido nos últimos anos uma correlação entre as doenças crónicas e a presença de imunotoxicidade, doenças estas que têm incidência não só na população adulta mas também sob a população pediátrica onde se verifica que a disfunção imunológica funciona como um veículo propulsor de diversas doenças crónicas como a asma, a psoríase, a doença de Alzheimer, a depressão, a aterosclerose, a diabetes e a artrite reumatóide (Farmer e Dietert, 2013).

Para avaliar a imunidade constitui-se cinco grupos tendo cada grupo 20 elementos repartidos equitativamente por sexo, em que dois dos grupos correspondem aos grupos controlo sendo que um deles apenas é submetido à toma do veículo do novo fármaco para se analisar a magnitude da produção de anticorpos sem a administração de qualquer substância, enquanto que o segundo grupo controlo toma imunossuppressores como a ciclofosfamida, a ciclosporina A ou a dexametasona cuja dose foi previamente ajustada em função do objetivo do estudo que se pretende realizar. No que diz respeito aos três grupos teste, estes são submetidos a três doses distintas, ou seja, a uma dose alta, a uma dose intermédia e a uma dose baixa com o intuito de se determinar a dose que desencadeia a alteração leucocitária, a modificação morfológica dos tecidos linfáticos, uma perda do peso corporal igual ou inferior a 10% ou uma redução no consumo de alimentos. Findo o estudo analisa-se os parâmetros hematológicos que incluem a contagem das células do sistema imunitário (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células NK) e de anticorpos, o peso dos órgãos linfáticos (timo e baço) bem como as suas alterações histopatológicas (EMA, 2006).

3.8 Ensaio de toxicidade para a população pediátrica

Estima-se que 70% dos medicamentos usados na população pediátrica foram testados apenas em adultos havendo um desconhecimento do perfil terapêutico a administrar nesta população. Desta forma, assiste-se a um risco acrescido de efeitos adversos, muitas vezes resultantes do excesso de dose ou da ineficácia do tratamento, o que conduz a uma maior relutância na prescrição de medicamentos por parte dos médicos devido à ausência de informação que sustente a relação risco/benefício (Throstrud *et al.*, 2013).

Antes de se começar os ensaios toxicológicos para a população pediátrica devem ser conhecidos os dados sobre a segurança farmacológica da nova molécula originários dos ensaios toxicológicos por dose repetida, dos ensaios de genotoxicidade e dos ensaios toxicológicos na função reprodutora (Baldrick, 2004).

Quando se desenvolve este ensaio é preciso ter em atenção a imaturidade dos sistemas nos primeiros anos de vida do ser humano, nomeadamente de que o sistema renal

matura a um ano de idade, o sistema pulmonar aos dois anos, o sistema imune aos doze anos, os órgãos envolvidos nos processos de absorção e distribuição na adolescência e o sistema reprodutor, esquelético e nervoso na idade adulta. Também os aspetos clínicos devem ser valorizados como, por exemplo, se o fármaco se destina exclusivamente ou predominantemente ao tratamento de doenças do foro pediátrico, a duração do tratamento, a idade das crianças e os órgãos alvo da nova molécula, bem como os aspetos não clínicos que incluem os efeitos adversos observados (reversíveis e irreversíveis), o mecanismo de ação da nova molécula e os resultados farmacológicos de ensaios anteriores (Anderson *et al.*, 2009; Hurtt *et al.*, 2004).

Este ensaio tem como objetivo revelar os efeitos adversos do novo fármaco na população pediátrica e determinar o NOAEL. Os parâmetros avaliados neste estudo incluem a alteração das mucosas, do padrão de consumo de alimentos, do peso corporal, o aparecimento de patologias clínicas, o desenvolvimento dos vários sistemas: esquelético onde se determina o comprimento dos ossos (tíbia e fémur) e a densidade óssea; o neurológico que abrange a atividade motora, a capacidade de resposta, a aprendizagem e a memória; o renal; o pulmonar; o imunológico e o reprodutivo e os parâmetros hematológicos (EMA, 2008).

A espécie de roedor geralmente utilizada é o rato visto já existirem dados prévios sobre o desenvolvimento dos órgãos e a maturação do organismo ser atingida num período de tempo relativamente curto (EMA, 2008).

A idade com que os animais iniciam o ensaio está dependente do grau de desenvolvimento dos órgãos, dos órgãos alvo de toxicidade do novo fármaco e da duração pretendida para o tratamento; a via de administração deve ser aquela que será utilizada na população pediátrica, a não ser que o uso de outra via proporcione informação mais relevante para os estudos clínicos (EMA, 2008).

3.9 Ensaio de tolerância local

A elaboração deste ensaio pretende obter informação sobre a tolerância que as diferentes partes do organismo têm quando entram em contacto com as matérias-primas (substância ativa e excipientes) veiculadas na forma farmacêutica devendo a dose, a via

e a frequência de administração ser as mesmas do contexto clínico embora, regra geral, o período do ensaio não seja superior a 4 semanas. No que se refere à seleção da espécie, esta é feita em função da parte do organismo que se pretende avaliar a tolerância sendo normalmente requerida uma espécie por ensaio (EMA, 2001).

Nesta etapa dos ensaios pré-clínicos realizam-se os seguintes testes: o teste de tolerância no local de administração, o teste de toxicidade sistémica, o teste de tolerância para vias específicas de administração e o teste para a análise do potencial de sensibilização. Existem porém alguns testes cuja elaboração é suprimida uma vez que os dados foram obtidos noutros ensaios sob condições adequadas (EMA, 2001).

O teste de tolerância local consiste em colocar o novo fármaco em contacto com os locais pelos quais entrará em contacto com o organismo humano após a sua administração, bem como os locais que poderá entrar em contacto em caso acidental ou devido à exposição inevitável ao produto. Antes de se iniciar o teste, deve-se ter em atenção os seguintes parâmetros: as propriedades físico-químicas, as propriedades toxicológicas, a farmacocinética e a farmacodinâmica do novo composto de forma a que o teste confira dados mais transponíveis para o contexto clínico (EMA, 2001).

O teste de toxicidade sistémica baseia-se na administração do fármaco que permita a sua exposição a nível sistémico, não sendo realizado em duas situações distintas: quando a absorção do fármaco é de tal forma reduzida que não produz efeitos sistémicos e quando a toxicidade sistémica já foi previamente estudada (EMA, 2001).

O teste de tolerância para vias específicas de administração é praticado nas vias pelas quais o fármaco entrará em contacto e, para tal, existem protocolos que especificam o procedimento a ter para cada uma das vias (dérmica, parentérica, ocular, retal e vaginal) (EMA, 2001).

O teste de tolerância dérmica baseia-se na administração da nova forma farmacêutica sobre a pele através de ensaios de exposição simples, de exposição repetida, de sensibilização e, em alguns casos, de fototoxicidade e fotossensibilização. No ensaio de exposição simples, quando se trata de um produto corrosivo, este é testado *in vitro* evitando assim o sofrimento desnecessário de animais. Na ausência de danos, o modelo

animal selecionado é o coelho, sendo o novo produto posto em contacto com a pele numa área equivalente ao contexto clínico e registam-se os dados observados em períodos de 24, 48 e 72 horas referentes à evolução do grau de eritema, edema, descamação, formação de crostas, entre outras lesões. Por sua vez, o ensaio de exposição repetida abarca um período de tempo superior a 4 semanas e segue as mesmas diretrizes que o ensaio de exposição simples (EMA, 2001).

O teste de tolerância parentérica pode ser realizado nas seguintes vias: intravenosa, arterial, intramuscular, intratecal, subcutânea ou intra-arterial e, de acordo com a via de administração, elege-se o local a aplicar no modelo animal. Assim, para a via intravenosa aplica-se o injetável nas veias da orelha, da cauda ou da parte posterior dos membros; para a via arterial opta-se pela veia central nos coelhos e nos restantes modelos pela artéria femoral; para a via intramuscular aplica-se nos músculos do dorso ou do fémur; para a via subcutânea aplica-se o tecido adiposo que reveste a caixa torácica e para via intra-arterial aplica-se no tecido que reveste o pescoço (EMA, 2001).

À semelhança do teste de tolerância dérmica, para o teste de tolerância parentérica também se efetua ensaios de toxicidade simples e repetida. O ensaio de toxicidade simples consiste numa única administração e na observação do local de administração e tecidos circundantes por exames histológicos após 48 a 96 horas, enquanto que as observações no exame de toxicidade repetida são verificadas ao fim de 7 dias (EMA, 2001).

Os procedimentos do teste de tolerância ocular são determinados de acordo com o contexto em que o olho ficará exposto na situação real, ou seja, realizam-se ensaios de exposição simples para os compostos cuja administração é única como acontece com os compostos com propriedades anestésicas e os ensaios de exposição repetida para colírios destinados a tratamentos crónicos. Em ambos os ensaios são observadas as áreas que circundam o olho nomeadamente as pálpebras, a membrana ocular, a conjuntiva, a córnea e a íris (EMA, 2001).

O teste de tolerância retal é conduzido normalmente em coelhos ou cães cuja forma galénica é administrada uma a duas vezes por dia durante uma semana. No decurso do estudo efetuam-se observações à região anal, ao esfíncter e às fezes (verifica-se a

presença de sangue e muco). Findo o estudo, os animais são sacrificados e procede-se ao exame macroscópico da região retal e, em seguida, ao exame histológico da região anal (EMA, 2001).

O teste de tolerância vaginal é muito similar ao teste de tolerância retal visto que recorre aos mesmos modelos animais, tem a mesma frequência de administração da fórmula galénica e o mesmo período de duração. Ao longo do ensaio regista-se as alterações na região vaginal, sinais clínicos como a presença de dor e as secreções vaginais (sangue e muco). No final do estudo os animais são sacrificados e realiza-se o exame macroscópico e microscópico do trato vaginal e avalia-se os órgãos reprodutores (EMA, 2001).

Um dos ensaios que se insere nos ensaios de tolerância local é o teste para a análise do potencial de sensibilidade, embora nem sempre seja necessário a sua realização. Recorre-se apenas a este ensaio quando se está na presença de produtos farmacêuticos que entrarão em contacto direto com a pele, o trato retal ou vaginal podendo-se utilizar dois sistemas distintos: o ensaio no porquinho da índia ou o ensaio do linfonodo local em camundongos (EMA, 2001).

Capítulo IV – Dos ensaios pré-clínicos aos ensaios clínicos

Quando os dados do novo fármaco se encontram suficientemente estudados, o que pressupõe que haja informação referente ao modo de obtenção da substância ativa, à estrutura química, à estabilidade, à fórmula galénica, à atividade farmacológica, toxicológica e farmacocinética, inicia-se a última etapa do processo de pesquisa e desenvolvimento designada de ensaios clínicos. Estes ensaios consistem na avaliação experimental do novo fármaco através da sua administração no homem tendo em linha de conta a verificação dos seguintes parâmetros: os dados farmacodinâmicos e farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e excreção) no organismo humano; a eficácia do novo medicamento para profilaxia, tratamento ou diagnóstico, o perfil de reações adversas e o intervalo de segurança (FDA, 2014).

Os ensaios clínicos integram uma sequência lógica de quatro de fases sendo ao longo do seu decurso averiguados os diferentes objetivos propostos para esta etapa de desenvolvimento do novo medicamento (del Castillo e Lorente, s.d.).

Na fase I realizam-se os estudos farmacológicos no ser humano. Neste primeiro estudo é demonstrada a segurança e a tolerância do organismo humano ao novo medicamento e, em simultâneo, é definida a janela terapêutica mediante os dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos para as etapas posteriores, visto que é nesta fase que se determina a dose máxima tolerável, os tipos de reações e as possíveis interações com os alimentos. Os estudos de fase I têm uma duração compreendida entre os 9 e os 18 meses e são efetuados em voluntários saudáveis que correspondem a uma amostragem de dimensão reduzida, normalmente entre 30 a 100 indivíduos, podendo o tipo de ensaio ser aberto, uni-cego, duplo-cego ou triplo-cego (Center Watch, 2014; del Castillo e Lorente, s.d.).

Os estudos de fase II têm como objetivo determinar a eficácia do fármaco de acordo com a indicação terapêutica proposta, bem como estabelecer a dose terapêutica e o regime posológico para os ensaios de fase III. Além da verificação dos objetivos citados anteriormente, é nesta fase que se continua a avaliação da segurança e da farmacocinética nos doentes e se estuda o mecanismo de ação do fármaco no ser humano. A fase II desenrola-se num período de tempo entre 1 a 3 anos e a amostra que integra este estudo tem dimensão superior à anterior (100 a 400 doentes), embora os

critérios de seleção sejam mais restritivos com o intuito de se dispor de uma amostra homogênea que permita comprovar a eficácia do novo medicamento com elevado grau de fiabilidade (del Castillo e Lorente, s.d.).

Os ensaios clínicos na fase III constituem um passo fundamental para o lançamento do novo medicamento no mercado porque é nesta fase que se compara a eficácia e a segurança do novo fármaco com os já existentes no mercado para a mesma indicação terapêutica, reproduzindo-se assim as condições de uso terapêutico habitual uma vez que envolve indivíduos (1000 a 3000) com a doença para o qual o novo fármaco se destina. É neste momento que se justifica a introdução do novo fármaco no mercado em relação aos já existentes, quer seja pelo facto do medicamento apresentar uma maior segurança, um menor custo, uma novidade terapêutica, uma maior rapidez no efeito terapêutico ou uma menor frequência de administração. A duração deste estudo corresponde a um período compreendido entre 1 e 4 anos (Borges; 2013; del Castillo e Lorente, s.d.).

A fase IV integra a comercialização do novo medicamento e, por isso, existe uma amostra populacional de grandes dimensões pelo que é nesta fase que surgem novas indicações terapêuticas, vias de administração e novas formulações galénicas. Os estudos realizados nesta fase têm uma duração indefinida o que permite um controlo da eficácia e da toxicidade a longo prazo através da farmacovigilância (del Castillo e Lorente, s.d.; Garcia, Menco e Hernández, 2008).

Os estudos clínicos não serão aqui aprofundados dado que estão fora do âmbito deste trabalho.

Capítulo V – As limitações dos ensaios toxicológicos e a sua evolução

5.1. As incertezas dos ensaios pré-clínicos

Ao longo dos ensaios toxicológicos é realizada a extrapolação científica dos dados qualitativos e quantitativos obtidos em modelos animais para o homem. Os parâmetros de natureza qualitativa estão associados ao tipo de resposta tóxica observada nos animais e os parâmetros de natureza quantitativa correspondem à duração do tratamento e ao impacto da dose sobre o organismo (Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

Todas as formas de extrapolação são meramente especulativas porque se baseiam apenas em modelos preditivos para cumprir as diretrizes definidas pelas diferentes agências reguladoras, garantindo deste modo a proteção do ser humano perante as propriedades toxicológicas de cada substância presente no meio ambiente, nos alimentos ou nos medicamentos (Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

A determinação do risco proveniente da exposição do ser humano a potenciais substâncias tóxicas baseia-se nos dados obtidos a partir de estudos experimentais que envolvem sempre extrapolações entre espécies diferentes e a mesma espécie e, em algumas situações, é imprescindível o cruzamento de dados entre doses, vias de administração e o tempo de administração. A utilização dos diferentes tipos de extrapolação está dependente de dois requisitos: a situação que se pretende avaliar e a natureza dos dados disponíveis por forma a recolher toda a informação relevante que ateste a segurança do novo composto. Porém é necessário ter em consideração que todas as formas de acesso ao risco têm incertezas associadas e, por isso, os toxicologistas interrogam-se sobre a veracidade dos dados obtidos ao longo do estudo para que o novo fármaco seja introduzido no mercado sem colocar a segurança do Homem e do meio circundante em causa (Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

O método experimental apresenta cinco tipos de extrapolação: a extrapolação entre espécies diferentes descreve a relação dose-resposta na população humana tendo como base as alterações de comportamento e os efeitos observados nos animais aquando da administração de diferentes doses; a extrapolação entre a mesma espécie pretende elucidar a repercussão que as características de variabilidade interindividual podem ter

na resposta ao novo fármaco no momento em que for administrado na população humana; a extrapolação entre doses tem como objetivo definir a dose a partir do qual se verifica toxicidade e a dose a partir do qual ocorre um efeito subterapêutico estabelecendo-se assim a janela terapêutica; a extrapolação por vias de administração distintas prevê os efeitos adversos prováveis na população humana quando o fármaco é administrado por via oral e a extrapolação por diferentes períodos de tempo determina a relação existente entre a resposta tóxica observada e o período de exposição ao novo fármaco (Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

A extrapolação de dados toxicológicos de umas espécies para as outras impõe que vários fatores sejam ponderados visto que pequenas diferenças entre organismos podem conduzir a respostas farmacológicas divergentes (Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

Normalmente os modelos animais utilizados nos ensaios toxicológicos são bons indicadores de toxicidade para o homem, embora haja pequenas diferenças responsáveis pela desigualdade que se observa quando se administra o fármaco em várias espécies. A principal razão pela qual se constata discrepâncias entre o modelo animal e o ser humano deve-se à toxicocinética, ou seja, a capacidade que o novo fármaco tem para atingir o local alvo, e à toxicodinâmica, isto é, a capacidade que o local alvo tem para alojar o fármaco mediante os recetores e a afinidade que apresenta para a nova entidade química bem como os mecanismos de defesa (proliferação de células, apoptose e reparação de tecidos) presentes no local alvo. Outra razão pela qual não há uma extrapolação linear dos dados está relacionada com as diferenças anatómicas e fisiológicas, sendo que os animais de pequenas dimensões tendem a metabolizar os agentes tóxicos mais rapidamente que o homem porque o peso do fígado é maior, a taxa de perfusão dos hepatócitos é mais elevada e a atividade enzimática dos mamíferos aumenta com o decréscimo do peso corporal. É sabido que a suscetibilidade de cada espécie para o novo fármaco está dependente da capacidade de biotransformação que muitas vezes se encontra limitada por deficiências em determinadas reações metabólicas ou pelas enzimas envolvidas na etapa de metabolização. Além das diferenças mencionadas anteriormente, os modelos animais apresentam características exclusivas que não se verificam na espécie humana a nível anatómico como o saco vitelino que fornece os nutrientes ao embrião, a presença de múltiplas mamas nos indivíduos de sexo feminino, a ausência de vesícula biliar e heterogeneidade no estômago; a nível

fisiológico, alguns animais não possuem o reflexo emético; a nível nutricional, a dose diária recomendada de vitaminas e minerais difere e os animais apresentam alguns comportamentos que não são observáveis na espécie humana (Dybing *et al.*, 2002).

A extrapolação entre a mesma espécie é influenciada por vários fatores entre os quais se destacam a variabilidade genética, o género, a faixa etária, o estado nutricional, o estado de saúde, a exposição ambiental a diversos agentes químicos e a capacidade do organismo para reparar as lesões induzidas pelos diferentes compostos (Dybing *et al.*, 2002).

A variabilidade dos níveis de expressão da atividade enzimática associada à detoxificação de xenobióticos afeta profundamente a resposta metabólica por parte dos indivíduos devido às suas diferenças genéticas que ocorrem em níveis superiores a 1 %, sendo este processo designado de polimorfismo genético. O polimorfismo genético pode ter várias origens, sendo a mais comum a ocorrência de uma mutação que consiste na troca de um nucleótido por outro, contudo podem ocorrer fenómenos mais complexos que se baseiam na inserção ou deleção de vários nucleótidos o que conduz a alterações em várias regiões do gene repercutindo-se na formação de diferentes proteínas que afetam o processo de biotransformação (Dybing *et al.*, 2002; Favor *et al.*, 1995).

O género intervém nos seguintes parâmetros: peso corporal, distribuição do tecido adiposo, fluxo de irrigação dos hepatócitos e no tipo de proteínas, o que justifica o facto dos indivíduos do sexo feminino metabolizarem mais rapidamente os fármacos que os indivíduos do sexo masculino já que as isoenzimas metabólicas predominantes no sexo feminino correspondem ao CYP1A2, 3A4 e 7A1, enquanto que no sexo masculino são as CYP3A5 e 27B1, e a maioria dos fármacos serem metabolizados pelas CYP3A4 e 1A2 (Zanger e Schwab, 2013).

Dentro da mesma espécie existe variabilidade ao longo das diferentes faixas etárias uma vez que durante a gravidez ocorrem mudanças fisiológicas para sustentar o crescimento do feto o que influencia a toxicocinética dos compostos visto que a motilidade gastrointestinal diminui e como consequência a absorção dos compostos hidrófilos torna-se reduzida, o volume de distribuição aumenta devido à expansão dos tecidos, a

quantidade de albumina diminui e a taxa de filtração renal aumenta, sendo o fármaco eliminado mais rapidamente. Nas primeiras semanas de vida a resposta aos fármacos difere da do adulto porque as barreiras fisiológicas que protegem os órgãos não estão totalmente desenvolvidas, havendo uma rápida absorção dos fármacos a nível do SNC e pelo trato gastrointestinal e as taxas de metabolização e de eliminação do fármaco não ocorrem com a mesma eficácia que se verifica no adulto, o que faz com o fármaco permaneça mais tempo no organismo (Dybing *et al.*, 2002).

O estado nutricional de cada indivíduo influencia a biodisponibilidade da substância ativa no organismo. De facto, os estudos científicos revelaram que a carência em sais minerais (cálcio, ferro, magnésio e zinco) provoca um decréscimo da atividade do citocromo P450 e a falta de vitaminas do complexo B, C e E perturba a regulação do sistema citocromo P450. Por outro lado, a prática de uma alimentação equilibrada e saudável promove a longevidade dos seres vivos em estudo e reduz a taxa de incidência de tumores com origem espontânea e induzidos pela exposição a determinados agentes químicos (Dybing *et al.*, 2002).

O estado de saúde é determinante para o sucesso da terapêutica, embora o fígado apresente um papel preponderante na metabolização do novo fármaco. Quando o fígado se encontra lesado o que acontece é que o fluxo sanguíneo, a taxa de albumina e o número de hepatócitos viáveis decrescem o que resulta num aumento das concentrações de fármaco nos tecidos desencadeando assim efeitos tóxicos (Dybing *et al.*, 2002).

A capacidade do organismo para reparar as lesões induzidas pelos diferentes compostos integra uma sequência de eventos que decorrem desde o momento de absorção do novo fármaco até à sua eliminação. Quando o fármaco é administrado, parte deste é absorvido e posteriormente metabolizado e conjugado para a sua eliminação. Contudo, durante o processo de metabolização, formam-se metabolitos ativos que interagem com as células danificando-as. Cada organismo dentro da mesma espécie possui uma sensibilidade distinta verificando-se a existência de quatro fenómenos: uma proporção das células não é reparada e morre; uma proporção de novas células é produzida para substituir as células mortas; uma proporção de células afetadas pelos metabolitos reativos sobrevive devido aos mecanismos de reparação do ADN e uma proporção de células divide-se descontroladamente levando à formação de tumores, sendo o balanço entre os quatro

fenómenos que determina a presença ou ausência de mecanismo de carcinogénese (Dybing *et al.*, 2002).

A extrapolação entre doses é um requisito para a caracterização dos potenciais riscos decorrentes da exposição a agentes químicos e o ponto de partida para a avaliação da segurança. A caracterização do risco é feita pelas curvas dose-resposta de onde se retiram os valores de NOAEL e LOAEL, definindo-se desta forma a janela terapêutica. A dose administrada não corresponde à dose que atinge a circulação sistémica devido às características físico-químicas do novo fármaco e ao facto de o novo composto ser alvo de metabolização ou até mesmo de decomposição por ação do pH e das enzimas do trato gastrointestinal. As moléculas com potencial carcinogénico têm de exibir uma probabilidade de incidência cancerígena inferior a 1 em 10.000 seres vivos, o que requer que sejam sujeitos a ensaios toxicológicos dezenas de milhares de animais o que se torna inexecutável em contexto pré-clínico e, para ultrapassar esta limitação, aumentam-se as doses até uma concentração onde se constate uma taxa de incidência de cancro superior a 10% quando comparado com o grupo controlo (Dybing *et al.*, 2002; Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

De acordo com as diretrizes delineadas para os ensaios toxicológicos pré-clínicos, os efeitos toxicológicos no momento de administração do novo fármaco devem ser estimados em mais do que uma via de administração por forma a diminuir o grau de incerteza associado às extrapolações. Normalmente os agentes tóxicos desencadeiam efeitos adversos perto ou até mesmo no local de administração (por exemplo quando se administra um fármaco por via inalatória verificam-se efeitos adversos no trato respiratório, quando se utiliza a via oral observa-se efeitos ao longo do TGI e quando se recorre à via dérmica observa-se reações na pele). Contudo, o recurso a diferentes vias de administração permite apenas uma extrapolação qualitativa das reações adversas que a dose de fármaco poderá induzir no local de ação porque os tecidos do organismo possuem diferentes sensibilidades e mecanismos de ação. Relativamente aos efeitos sistémicos estes são apurados com base na quantidade de fármaco administrado em miligramas por quilograma de massa corporal, tendo em consideração a concentração de fármaco que é absorvido pelas diferentes vias de administração (Rodricks, Gaylor e Turnbull, 2001).

No que se refere à extrapolação temporal, os modelos animais são expostos durante um período de tempo que permita mimetizar a duração do tratamento farmacológico no ser humano para que os dados obtidos na extrapolação do contexto pré-clínico para o clínico sejam os mais válidos possíveis. As normas para os estudos de toxicidade por dose repetida indicam as espécies roedoras como as mais adequadas devido às semelhanças fisiológicas com o organismo humano, porém, os roedores têm uma esperança média de vida de 2 anos o equivale a 70 anos de vida da espécie humana. Apesar desta limitação, existem outras questões que se levantam com a extrapolação temporal nomeadamente com compostos que exigem um tempo de eliminação muito grande devido à tendência que têm em bioacumular-se nos tecidos, sendo impossível perante estes estudos constatar-se os processos de reversibilidade e de reparação que ocorrem ao longo do tempo. É preciso ter em mente que o processo de extrapolação temporal não é fácil e está dependente dos dados de toxicodinâmica e de toxicocinética do fármaco, embora o período no qual se observam os efeitos decorrentes da exposição ao novo fármaco não seja suficiente para constatar todos os efeitos, entre os quais se destaca os processos de hiperplasia que levam ao aparecimento de tumores que demoram anos a ocorrer (Dybing *et al.*, 2002).

5.2 Perspetivas futuras dos ensaios toxicológicos

Na última década, a informação expressa pelos genes é empregue pela indústria farmacêutica como uma ferramenta que faculta a baixo custo e num curto espaço de tempo a identificação das moléculas mais seguras para o homem, antecipando os efeitos adversos e a falta de eficácia terapêutica (Bates, 2011).

Atualmente a indústria farmacêutica tem aplicado parte dos seus recursos no desenvolvimento da toxicogenómica e reunido esforços para que esta área seja implementada nas normas protocoladas para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. A toxicogenómica fornece a informação expressa pelos genes através dos quais revela: as alterações provocadas pelo novo fármaco nos processos fisiológicos e bioquímicos; a compreensão das alterações moleculares do fármaco que acontecem *in vivo* permitindo a alteração e conseqüente otimização da molécula candidata e prevê os possíveis efeitos adversos devido às alterações que ocorrem na expressão de genes funcionarem como biomarcadores da toxicidade, participando assim numa fase

prematura do desenvolvimento dos novos fármacos na seleção das moléculas mais promissoras (Yang, Blomme e Waring, 2004).

Além da toxicogenómica, também a proteómica tem afirmado nos últimos anos o seu contributo junto da indústria farmacêutica, sendo as aplicações mais comuns a identificação do local alvo da terapêutica, a identificação de biomarcadores no plasma e a determinação do mecanismo de ação e de toxicidade do novo fármaco (Walgren e Thompson, 2004).

A identificação do local alvo da terapêutica é feita através das proteínas visto que a maioria dos fármacos atua sobre as proteínas do sangue, enzimas, canais iónicos e recetores das membranas celulares porque normalmente as doenças desencadeiam alterações na estrutura, na localização ou na quantidade de proteínas (Lanças *et al.*, 2003).

Na área da toxicologia, a proteómica pode ser utilizada como biomarcador nas seguintes situações: para o diagnóstico de doenças, para investigar os efeitos adversos dos fármacos e respetivos metabolitos, para comparar a relação risco/benefício entre classes de fármacos, para prever o mecanismo de ação de um novo composto e para aceder à eficácia de novos fármacos desenvolvidos para a prevenção, tratamento ou diagnóstico de doenças (Jhanker *et al.*, 2012)

A determinação dos mecanismos de ação e de toxicidade dos fármacos é efetuada pelo estudo sistemático da quantidade de proteínas presentes nos tecidos ou órgãos ao longo do tempo (Walgren e Thompson, 2004).

A proteómica em conjunto com a toxicogenómica revela os locais alvo dos fármacos bem como os biomarcadores das doenças. Através dos biomarcadores, o tempo e o investimento económico serão reduzidos significativamente para que um novo fármaco seja introduzido no mercado visto que ambas as áreas são capazes de, num estadio prematuro do processo de desenvolvimento de novos fármacos, selecionar os compostos mais promissores e de eliminar os que demonstrem toxicidade excessiva ou ineficácia terapêutica (Bandara e Kennedy, 2002).

Apesar de promissoras, estas tecnologias mostram algumas limitações que incluem a necessidade de métodos capazes de interpretar e correlacionar de forma otimizada as informações geradas e a aplicação dos dados biológicos de forma racional e efetiva no planeamento de fármacos (Bhogal e Balls, 2008).

Capítulo VI – Conclusão

Após a descoberta de um novo fármaco promissor é obrigatória a realização de uma bateria de ensaios de triagem denominados pré-clínicos antes de serem iniciados estudos em humanos. Os estudos pré-clínicos para avaliação de efeitos potenciais e riscos para o ser humano podem ser divididos em três grandes grupos: os farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos. A realização de ensaios de toxicidade em fases precoces desempenha um papel relevante, permitindo antecipar riscos e reduzir a probabilidade de compostos promissores falharem em etapas mais avançadas e dispendiosas.

Perante os dados recolhidos nos estudos toxicológicos e se estes forem indicadores da segurança e eficácia do novo fármaco, inicia-se uma nova etapa designada de ensaios clínicos onde a segurança do fármaco é testada diretamente no homem para posteriormente o fármaco ser introduzido no mercado. No entanto, 99% das moléculas candidatas não atingem os ensaios clínicos porque os ensaios toxicológicos pré-clínicos constituem um “filtro” que identifica as moléculas com problemas de segurança e eficácia, contribuindo assim para uma redução significativa dos custos associados ao desenvolvimento do novo fármaco.

Os contributos da toxicogenómica e da proteómica aliados à inovação tecnológica farão com que o desenvolvimento de novos fármacos seja cada vez mais eficiente porque a estrutura do fármaco será concebida em função das características fisiopatológicas do doente reduzindo desta forma o número de interações entre os sistemas biológicos.

Nas próximas décadas, a área da toxicologia em conjunto com outras áreas continuará a evoluir para proporcionar à sociedade terapêuticas com maior qualidade, segurança e eficácia.

Capítulo VII – Bibliografia

Anderson, T. *et al.* (2009). Comparative juvenile safety testing of new therapeutic candidates: relevance of laboratory animal data to children. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34, pp. 209-215.

Baldrick, P. (2004). Developing drugs for pediatric use: a role for juvenile animal studies?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, pp. 381-389.

Baldrick, P. (2003). Toxicokinetics in preclinical evaluation. *Drug Discovery Today*, 8(3), pp.127-132.

Bandara, R. L.; Kennedy, S. (2002). Toxicoproteomics – a new preclinical tool. *Drug Discovery Today*, 7(7), p.417.

Bates, S. (2011). The role of gene expression profiling in drug discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, p. 549.

Beck, B. D. *et al.* (2001). Use of Toxicology in the Regulatory Process. In Hayes, A. W. *Principles and Methods of Toxicology*. 4ª Edição. Estados Unidos da América. Editora Taylor & Francis, pp. 24-35.

Bessems, J. G. M.; Geraets, L.(2013). Proper knowledge on toxicokinetics improves human hazard testing and subsequent health risk characterization. A case study approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67, pp. 325-334.

Bhogal, N.; Balls, M. (2008). Translation of new technologies: from basic research to drug discovery and development. *Current Drug Discovery Technologies*, 5(3), pp. 250-262.

Borges, M. (2013). Ensaio Clínicos em Medicamentos. *Revista Portuguesa de Cirurgia*, 2(24), p.59.

Brusick, D. (2001). The Use of Toxicology in the Regulatory Process. In Hayes, A. W. *Principles and Methods of Toxicology*. 4ª Edição. Estados Unidos da América. Editora Taylor & Francis, p. 819.

CenterWatch. Overview of Clinical Trials. Disponível em «<http://www.centerwatch.com/clinical-trials/overview.aspx>». [Consultado em 29-09-2014].

Cunnighane, M.J. (2000). Genomics and proteomics – The new millenium of drug discovery and development. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, pp. 291-300.

del Castillo, J.M.M.; Lorente, M.J. (s.d.). Ensayos Clínicos con Productos Fitoterapéuticos. *Plantas Medicinales Y Fitoterapia IV*, pp. 131-136.

Denny, K.H., Stewart, C. W. (2013). Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In Faqi, A, S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. pp. 87-104.

Dietert, R.R.; Zelilkoff, J. T. (2009). Pediatric Immune Dysfunction and Health Risks Following Early-Life Immune Insult. *Current Pediatrics Reviews*, 5(1), pp.36-51.

Dorato, M. A.; Buckley, L. A. (2006). Toxicology in the Drug Discovery and Development Process. *Current Protocols in Pharmacology*. 32, 10.3.1–10.3.35.

Dorato, M. A; Vodcnik, M. J. (2001). The Toxicological Assessment of Pharmaceutical and Biotechnology Products. In Hayes, A. W. *Principles and Methods and Toxicology*. 4ª Edição, Editora Taylor & Francis, pp.137-150.

Dybing, E. *et al.* (2002). Hazard characterisation of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issue. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp. 247-261.

Elebring, T. (2012). What is the most important approach in current drug discovery: doing the right things or doing things right? *Drug Discovery Today*, 17 (21/22), pp. 1168.

Ekins, S. *et al.* (2000). Progress in Predicting Human ADME parameters in silico. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, pp.251-272.

European Agency Medicines. (1994). Note for guidance on the detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002809.pdf». [Consultado em 15-05-2014].

European Medicines Agency. (1999). Note for guidance on duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing). Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002800.pdf ». [Consultado em 5-04-2014].

European Medicines Agency. (2001). Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. [Em linha]. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003315.pdf». [Consultado em 11-09-2014].

European Medicines Agency. (2002). Note for guidance on carcinogenic potential. [Em linha]. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003258.pdf ». [Consultado em 19-08-2014].

European Medicines Agency. (2006). Note for guidance on immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. [Em linha]. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002851.pdf». [Consultado em 28-08-2014].

European Medicines Agency. (2007). Guidelines on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with medicinal products. Disponível em «

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002988.pdf ». [Consultado em 21/03/2014].

European Medicines Agency. (2008). Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile of pharmaceutical for paediatric indications. [Em linha]. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003305.pdf ». [Consultado em 05-06-2014].

European Medicines Agency. (2010a). Questions and answers on the withdrawal of the 'Note for guidance on single dose toxicity'. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094590.pdf ». [Consultado em 08/02/2014].

European Medicines Agency. (2010b). Guideline on repeated dose toxicity. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf ». [Consultado em 27-03-2014].

European Medicines Agency. (2012). ICH guideline: on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. [Em linha]. Disponível em « http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/12/WC500119604.pdf ». [Consultado em 07-07-2014].

European Medicines Agency. (2013). [Em linha]. Disponível em: «http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000397.jsp&mid=WC0b01ac058002956f ». [Consultado em: 30/11/2013].

Faqi, A. S. (2013). Introduction. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. p. 1.

Farmer, J. T.; Dietert, R. R. (2013). Immunotoxicology Assessment in Drug Development. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. pp. 365-379.

Favor, J. *et al.* (1995). Genetic risk extrapolation from animal to human disease. *Mutation Research*, 330, pp. 23-24.

Fowler, J.; Galli, G. L. (2007). EUROTOX's view regarding the ROLE and TRAINING of certified European registered toxicologists (ERT). *Toxicology Letters*, 168, pp. 194-195.

Food and Drug Administration. (2014). Protecting and Promoting Health. Disponível em « <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/default.htm>». [Consultado em 24-09-2014].

Friedrichi, A., Olejniczak, K. (2011). Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorized via the European centralized procedure (1995 – 2009). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 60, pp.225-248.

Gallo, M.A. (2001). History and scope of toxicology. In Casarett & Doulls. *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6ª Edição Nova Iorque. Editora McGraw-Hill. pp. 1-3.

Garcia, P. A. G.; Menco, A. A. e Hernández, R. D. M. (2008). La Farmacovigilancia: Aspectos Generales y Metodológicos. Disponível em « http://bdigital.ces.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/323/2/La_farmacovigilancia_aspectos_generales_metodologicos.pdf». [Consultado em 29/09/2014].

Gatehouse, D. *et al.* (1994). Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Environmental Mutagenesis*, 312, pp. 217-233.

Gouveia, B. G. (2013). Organizações e Autoridades Internacionais e Nacionais. Boas Práticas de Fabrico de Medicamentos Para Uso Humano. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. p.7.

Horii, J. (1998). Advantages of toxicokinetics in new drug development. *Toxicology Letters*, 102, pp.657-664.

Hornberg, J.J. *et al.* (2004). Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I. Why and how. *Drug Discovery Today*, 19 (8), pp.1131-1135.

Hulf, J. (1992). Long-term chemical carcinogenesis bioassays predict human cancer hazard: issues, controversies and uncertainties. *Ann N Y Acad Sci*, 895, pp.56-71.

Hurt, M. E. *et al.* (2004). Juvenile Animal Studies: Testing Strategies and Design. *Birth Defects Research*, 71, pp. 281-288.

Infarmed, 2010. Saiba mais sobre EMA. Disponível em «http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/SAIBA_MAIS_SOBRE/SAIBA_MAIS_ARQUIVO/26_EMA.pdf». [Consultado em 24-09-2014].

International Conference Harmonisation. (1994). Note for guidance on toxicokinetics: a guidance for assessing systemic exposure in toxicology exposure. Disponível em «http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002770.pdf». [Consultado em 14-09-2014].

International Conference Harmonisation. (2008). Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. Disponível em «http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S8/Step4/S8_Guideline.pdf». [Consultado em 24-09-2014].

International Conference Harmonisation. (2009). ICH M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. Disponível em «http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002720.pdf». [Consultado em 20-09-2014].

International Conference Harmonisation. (2011). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. [Em linha]. Disponível em

«http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf». [Consultado em 12-08-2014].

International Conference Harmonisation. (2014). [Em linha]. Disponível em «<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>». [Consultado em 30-01-2014].

Jhanker, Y. M. *et al.* (2012). Proteomics in Drug Discovery, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(8), p.10.

Kille, J. W. (2013). Regulatory Toxicology. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. pp. 688-689.

Kirkland, D. *et al.* (2011). A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721. pp.27-29.

Kleinman, M. H. *et al.* (2010). An evolution of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58. pp.224-232.

Lanças, F. *et al.* (2003). A Química Analítica do Proteoma. Disponível em «http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/06/6%20Art%20Proteoma.pdf». [Consultado em 24-09-2014].

Langman, L.J.; Kapur, B.M. (2006). Toxicology: Then and Now. *Clinical Biochemistry*, 39. pp. 498-510.

Marone, P.A., Hall, W.C. e Hayes, A.W. (2014). Reassessing the two-year rodent carcinogenicity bioassay: a review of the applicability to human risk and current perspectives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68. pp. 108-118.

McCann, J.; Ames, B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* / microsome test: assay of 300 chemicals. *Medical Sciences*. pp.950-953.

McCormick, D. L. (2013). Preclinical Evaluation of Carcinogenicity Using the Rodent Two-Year Bioassay. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. pp. 423-435.

Milburn, M.V., Ryals, J.A. e Guo. L. (2013). Toxicometabolomics: Technology and Applications. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. pp. 807-823.

Mortelamans, K.; Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella* / microsome mutagenicity assay. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455, pp. 29-60.

Morton, D. M. (1998). Importance of species selection in drug toxicity studies. *Toxicology Letters*, 102, pp. 545- 548.

Muller, L; Gocke, E. (2013). The rise and fall of photomutagenesis. *Mutation Research / Reviews in Mutation Research*, 752, pp. 67-71.

Muller-Tegethoff, K. *et al.* (1997). Application of the *in vitro* rat hepatocyte micronucleos assay in genetic toxicology testing. *Genetic and Environmentak Mutagenesis*, 392, pp. 125-138.

Nasciutti, P. R. (2012). Processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. *Desenvolvimento de novos fármacos*. p. 17.

Nicolette, J. (2013). Genetic Toxicology Testing. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição, Editora Elsevir, pp. 141-162.

Nugent, P., Duncan, J.N., Colagiovanni, D. B. (2013). The Preparation of a Preclinical Dossier to Support an Investigational New Drug (IND) Application and First-in-Human

Clinical Trial. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição, Editora Elsevir, pp. 318-333.

OECD, 2008. Test guideline 452: Chronic Toxicity Studies. Disponível em « <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/41753317.pdf> ». [Consultado em 24-09-2014].

OECD, 2009. OECD guideline for the testing of chemicals. Disponível em « <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741301e.pdf?expires=1411637682&id=id&accname=guest&checksum=30DACC51FCA789BCA12516A71613068B> ». [Consultado em 24-09-2014].

Patel, M.; Miller, M. A. (2012). Impact of regulatory science on global public health. *Journal of Medical Sciences*, 28, pp. 5-9.

Park, B. K. *et al.* (2001). Optimal dose identification: predicting a safe dose in man from animal studies. *International Congress Series*, 1220, pp. 13-25.

Pharmaceutical and Medical Devices Agency. (2011). PMDA International Vision – PMDA EPOCH Toward 2020. Disponível em « http://www.pmda.go.jp/english/international/pmda_international_vision.html ». [Consultado em 24-08-2014].

Renwick, A. G. (2000). Toxicokinetics: Pharmacokinetics in Toxicology. In Hayes, A. W. *Principles and Methods of Toxicology*. 4ª Edição, Editora Taylor & Francis, pp.137-150.

Rodrickes, J. V.; Gaylor, D. W. e Turnbull, D. (2001). Quantitive Extrapolations in Toxicology. *Principles and Methods of Toxicology*. 4ª Edição, Editora Taylor & Francis, pp. 365-383.

Sawant, S.G.; Fielden, M.R. e Black, K.A. (2014). Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70, pp.87-97.

Schou, J. S.; Hodel, C. M. (2003). The International Union of Toxicology (IUTOX) history and its role in information on toxicology. *Toxicology*, 190, pp. 117-118.

Schulte, A.; Ruetil-Fehlert, C. (2006). Regulatory aspects of immunotoxicology. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57 (5-6), pp.385-389.

Smithells, R.W.; Newman, C.G.H. (1992). Recognition of thalidomide defects. *J. Med. Genet*, 29, pp.716-723.

Snodin, D. J. (2004). Regulatory immunotoxicology: does the published evidence mandatory nonclinical immune function screening in drug development? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 40, pp. 336-355.

Stump. P. *et al.* (2013). Developmental and Reproductive Toxicology. In Faqi, A. S. A *Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição, Editora Elsevir, pp. 336-360.

Timbrell, J. A. (2009). *Principles of Biochemistry Toxicology*. 4ª Edição. Nova Iorque. Editora Informa Healthcare. pp.12-14.

Throsrud, B.A. *et al.* (2013). Juvenile Toxicity Testing to Support Clinical Trial in the Pediatric Population. In Faqi, A. S. A *Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevir, pp. 336-360.

Thybaud, V. *et al.* (2011). Strategies in case of positive *in vivo* results in genotoxicity testing. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 723, pp.121-128.

Trist, G.D. (2011). Scientific process, pharmacology and drug discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), pp.528

Vanparys, P. *et al.* (2012). Application of *in vitro* cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals chemicals, food products and cosmetics. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 744, pp.111-116.

Vrbanac, J; Slauter, R. (2013). ADME in Drug Discovery. In Faqi, A. S. *A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development*. 1ª Edição, Editora Elsevir, pp. 3-8.

Walgren, J. L.; Thompson, D. C.(2004). Application of proteomic technologies in drug development process. *Toxicology Letters*, 149, 377-385.

Yang, Y.; Blomme, E. A. G. e Waring, J. F. (2004). Toxicogenomics in drug discovery: from preclinical studies to clinical trials. *Chemico-Biological Interactions*, 150, pp.71-73.

Zanger, U. M.; Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138, pp. 105-109.