

Carolina Martins André Oliveira Ferreira

**Utilização de Modelos Farmacocinéticos de Base Fisiológica em Estudos  
Toxicológicos**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015



Carolina Martins André Oliveira Ferreira

**Utilização de Modelos Farmacocinéticos de Base Fisiológica em Estudos  
Toxicológicos**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Carolina Martins André Oliveira Ferreira

**Utilização de Modelos Farmacocinéticos de Base Fisiológica em Estudos  
Toxicológicos**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

---

(Carolina Martins André Oliveira Ferreira)

## Sumário

Os efeitos adversos decorrentes das interações de substâncias químicas com os organismos, devido a exposição voluntária ou involuntária, são objeto de grande preocupação por parte das autoridades de saúde e da população em geral. Atualmente, os efeitos tóxicos são ainda, responsáveis por uma percentagem significativa das falhas na fase final no desenvolvimento de fármacos.

A toxicocinética é normalmente descrita usando dois tipos de modelos - modelos empíricos ou modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK). Estes últimos traduzem o corpo humano como um conjunto de vários compartimentos, sendo que cada um representa fisiologicamente os órgãos, tecidos e outros espaços fisiológicos.

Nos modelos PBPK, o organismo interage com os compostos químicos, como um sistema integrado, isto é, um efeito que ocorra num desses compartimentos do corpo pode influenciar o que ocorre num outro compartimento completamente distinto. Estes modelos têm vindo a ser aperfeiçoados, o que tem permitido progressos muito importantes no esclarecimento da ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade), tanto em estudos de desenvolvimento de novos fármacos, como na compreensão da toxicocinética de certas substâncias, entre as quais os poluentes ambientais.

Mediante a modelação com base em modelos de base fisiológica, torna-se possível a obtenção de informações importantes, tais como a melhor via de administração ou posologia, mas também o conhecimento de variações que ocorram em função de determinadas patologias, vias de excreção, principais locais de distribuição e efeitos adversos. Esta abordagem apresenta, ainda, baixo custo e rapidez na obtenção de resultados, baseia-se, geralmente, em dados humanos e permite, facilmente, a investigação de compostos hipotéticos. Estas vantagens fazem com que a modelação baseada em modelos PBPK possua, atualmente, um papel preponderante na investigação toxicológica e que as variadas agências nacionais de regulação e avaliação de medicamentos e produtos de saúde recomendem os métodos *in silico* como complemento aos testes realizados em animais.

**Palavras-chave:** Estudos toxicológicos, modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK), farmacocinética, toxicocinética, métodos *in silico*.

## ***Summary***

The adverse effects resulting from the interactions of chemical substances with the human body, due to voluntary or involuntary exposure, are object of great concern by health authorities and the general population. Nowadays, the toxic effects still account for a significant percentage of the final phase faults in drug development.

The toxicokinetics is usually described by two types of models - empiric models or physiologically-based pharmacokinetic models (PBPK). The later describe the human body as a set of compartments corresponding to specific organs, tissues or other physiologic spaces.

In a PBPK model the organism is pictured like an integrated system, thus an effect that occurs in one of the compartments can influence other effect that occurs in another completely different compartment.

These models have been improved during the last three decades, which has allowed very significant progress in clarifying the ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity), in drug development studies and in the knowledge of toxicokinetics of substances such as environmental pollutants.

Modeling with physiologically-based pharmacokinetic models has contributed to obtain important information, such as the best route of administration or dosage, but also the knowledge of variations occurring under certain conditions, excretion routes, main distribution sites and adverse effects. This approach is also low cost and swifter in achieving results, it is generally based on human data and allows the investigation of hypothetical compounds easily. For all these reasons, modeling based in PBPK models currently has a leading role in toxicological research and the various national regulatory agencies and evaluation of medicines and health products recommend methods *in silico* as complementary to animal testing.

**Keywords:** Toxicological studies, physiologically-based pharmacokinetic modeling (PBPK), pharmacokinetics, toxicokinetics, *in silico* methods.

*“Alcança quem não cansa”*

Aquilino Ribeiro

## **Agradecimentos**

O final desta monografia marca o fim de uma longa viagem académica, como tal, gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de algum modo, contribuíram para que esta viagem fosse bem-sucedida.

Agradeço ao meu orientador, o Professor Doutor Sérgio Barreira, por toda a disponibilidade, colaboração, compreensão, paciência e auxílio prestado. Por todas as críticas, soluções e palavras de motivação apresentadas sem as quais não me teria sido possível concretizar este trabalho.

Aos meus pais, Jaime e Margarida e aos meus irmãos Luís e João por todo o incentivo, encorajamento, apoio e dedicação prestados ao longo destes anos e por me ajudarem a concretizar este sonho.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial às minhas melhores amigas, Ritinha, Inês, Laura, Rita e Rafaela. Pelas palavras sempre calorosas em todos os momentos.

À minha segunda família no Porto, Maria, Tiago, Manuel e Nuno, por todos os momentos de descontração e amizade que me proporcionaram.

A todos os meus colegas de curso, principalmente à Raquel, Carolina, Cláudia e Joana, por todos os momentos de entusiasmo partilhados durante estes cinco anos, sempre marcados pela emoção e amizade.

Agradeço ainda a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para o meu sucesso em mais uma etapa, a todas elas expesso o meu reconhecimento e gratidão.

## Índice

Índice de Figuras .....	xii
Índice de Tabelas .....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xv
I. Introdução.....	1
II. Modelos Farmacocinéticos de Base Fisiológica (PBPK) .....	3
II.1. Funcionamento dos Modelos de Base Fisiológica .....	11
II.2. Representação Matemática.....	14
II.3. <i>Software</i> utilizado.....	18
III. Estudos Toxicológicos.....	19
III.1. Mecanismos de toxicidade.....	19
III.2. Testes de toxicidade.....	20
III.2.1. Ensaios <i>in vitro</i> .....	20
III.2.2. Ensaios <i>in vivo</i> .....	21
III.2.3. Ensaios <i>in silico</i> .....	21
III.2.4. Fase Pré-Clínica.....	23
III.2.5. Fase Clínica .....	23
IV. Perspetiva histórica da utilização da modelação PBPK nos estudos toxicológicos .	26
IV.1. Estireno, Ramsey e Andersen, 1984 .....	27
IV.2. Diclorometano, Andersen <i>et al.</i> , 1987 .....	29
IV.2.1. Extrapolação Dose-baixa/Dose-alta .....	31
IV.2.2. Extrapolação inter-espécies .....	31
IV.3. Corley <i>et al.</i> , 2000 .....	31
IV.4. Fisher, 2000 .....	33
IV.5. Weijs <i>et al.</i> , 2010 .....	34
IV.6. Xia <i>et al.</i> , 2013 .....	36
IV.7. Crowell <i>et al.</i> , 2015 .....	37

IV.8. Tegenge e Mitkus, 2015 .....	39
V. Limitações da modelação PBPK .....	43
VI. Conclusão .....	44
VII. Referências Bibliográficas .....	46

## Índice de Figuras

Figura 1: Exemplo de um modelo do tipo monocompartimental após administração de dose intravenosa. Onde $Div$ representa a dose de fármaco administrada IV, $K_{el}$ corresponde à velocidade de eliminação do fármaco e $Q_{el}$ à quantidade de fármaco que é eliminada.....	3
Figura 2: Exemplo de modelo monocompartimental, onde a entrada de fármaco não ocorre de forma instantânea.....	4
Figura 3: Exemplo de modelo bicompartimental após uma administração IV. ....	5
Figura 4: Exemplo de modelo bicompartimental onde ocorre a administração do fármaco, segundo administração extravascular com absorção de primeira ordem.....	6
Figura 5: Exemplo de modelo tricompartmental aberto proposto por Kaplan <i>et al.</i> (1973) no qual as constantes $k_{12}$ , $k_{13}$ representam as velocidades individuais de distribuição do diazepam do compartimento central para os periféricos, superficial e profundo, respetivamente; e as constantes $k_{21}$ e $k_{31}$ dos respetivos periféricos para o compartimento central. ....	7
Figura 6: Estrutura geral de um modelo PBPK para um mamífero.....	9
Figura 7: Esquema ilustrativo dos processos envolvidos em PBPK. Adaptado de Andersen, M. (1987). <i>Pharmacokinetics in Risk Assessment, Drinking Water and Health</i> , National Academy Press, Washington, D.C., pp. 8–23.....	11
Figura 8: Modelo de base fisiológica de doze compartimentos proposto por Poulin e Theil.....	16
Figura 9: Esquema do processo de descoberta de um novo fármaco até ser introduzido no mercado. ....	23
Figura 10: Modelo farmacocinético utilizado para simular o comportamento do estireno inalado. ....	28
Figura 11: Diagrama do modelo PBPK utilizado para o DCM.....	30
Figura 12: Descrição da disposição do clorofórmio em ratos, ratinhos e humanos através de inalação, exposição via oral, injeção intraperitoneal, infusão intravenosa e exposição através da pele. ....	32
Figura 13: Modelo PBPK de primeira geração utilizado no estudo do TCE e do seu metabolito oxidativo em ratos e em humanos. O TCE é inalado ou ingerido através da água e nos ratinhos é administrado por uma sonda/bólus oral. O TCE distribui-se pelos compartimentos corporais e ou é metabolizado no fígado para TCA ou expirado. ....	34

Figura 14: Modelo PBPK para o PCB 153 em machos e fêmeas de <i>Phocoena phocoena</i> . (* – Somente aplicado às fêmeas. ....	35
Figura 15: Modelo PBPK proposto por Xia <i>et al.</i> ....	36
Figura 16: Modelo PBPK no rato. ....	38
Figura 17: Modelo PBPK para o humano. ....	38
Figura 18: Modelo PBPK esquemático, realizado a alfa tocoferol após a injeção IM em vacinas contra a gripe. ....	40

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1: Resumo das Fases do processo de desenvolvimento de um novo fármaco....	25
Tabela 2: Algumas substâncias/fármacos cuja toxicocintética foi estudada recorrendo a modelos PBPK.....	41
Tabela 2 (cont.): Substâncias/fármacos cuja toxicocinética foi estudada recorrendo a modelos PBPK.....	42

## **Lista de Abreviaturas**

ACAT - *Advanced compartmental absorption and transit*

ADME - Administração Distribuição Metabolização Excreção

ADMET – Administração Distribuição Metabolização Excreção Toxicidade

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AUC – “Área sob a curva de concentração”

CL - *Clearance*

DCM – Diclorometano

DLM - Deltametrina

EMEA - Agência Europeia de Medicamentos

GSH – Glutathiona

IV – Administração intravenosa

LCR – Líquido cefalorraquidiano

PBPK – Modelos farmacocinéticos de Base Fisiológica

PD - Farmacodinâmica

PK – Farmacocinética

PPM – “Partes por milhão”

QSAR - *Quantitative structure-activity relationships*

$V_{\text{máx}}$  – Volume máximo

TCA – Ácido tricloroacético

TCE - tricloroetileno

## I. Introdução

Quando uma substância química é introduzida no organismo, quer seja através de administração intencional ou exposição não intencional, através de várias vias, pele, via intravenosa, via pulmonar, rectal ou vaginal, é metabolizada e/ou distribuída em maior ou menor extensão, para os diferentes tecidos do organismo. (Nestorov, 2007). Se essa substância não é normalmente produzida no organismo, não faz parte da sua dieta, ou existe numa concentração muito superior ao nível normal denomina-se de xenobiótico. (Hayes, 2001).

Desde o momento da sua administração no organismo, até que são excretadas, as substâncias químicas passam por vários processos, absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME). Normalmente estes processos farmacocinéticos são somente associados à toma ou administração de um fármaco, mas, na realidade encontram-se associados a todas as substâncias químicas, como drogas, pesticidas, contaminantes ambientais ou produtos vegetais que são, de alguma forma, introduzidos no organismo humano. (Williams *et al.*, 2000).

Deste modo, como complemento aos estudos farmacocinéticos, surgiu a toxicocinética, que visa, através de estudos de toxicidade em animais e humanos, fornecer informação acerca dos efeitos adversos associados à exposição ao composto de origem e dos seus metabolitos, bem como outros aspetos importantes como a acumulação proveniente de exposição crónica a um composto tóxico. (Dahl, 2009).

No caso específico dos fármacos, os efeitos tóxicos são muitas vezes encontrados tardiamente, quer ainda no desenvolvimento da substância, quer nos ensaios clínicos, e representam uma proporção significativa das falhas no desenvolvimento de medicamentos. (Ekins *et al.*, 2000). Além das perdas de quantias dispendiosas por parte das indústrias farmacêuticas e de todo o perigo que representam em termos de toxicidade para os animais ou para as pessoas em quem os novos medicamentos são testados. Por conseguinte, torna-se primordial localizar a fonte de toxicidade o mais cedo possível. (Dearden, 2003).

Devido a estes motivos, ultimamente, as empresas farmacêuticas têm antecipado os seus estudos de ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade) para o início do processo de desenvolvimento de novos medicamentos, mesmo antes de um candidato a novo fármaco chegar a ser sintetizado. (Dearden, 2003).

Nos últimos quarenta anos o estudo da farmacocinética e da farmacodinâmica (PK/PD) e toxicocinética evoluiu desde a utilização de conceitos mais básicos como a relação dose-resposta para o uso de modelos matemáticos sofisticadíssimos, os chamados modelos farmacocinéticos, o que permitiu um maior conhecimento dos mecanismos subjacentes da ação dos medicamentos e/ou compostos tóxicos. Para isto foram determinantes os progressos registados nas áreas da fisiologia, química, a constante melhoria das metodologias analíticas e os avanços informáticos no que toca a *hardware* e *software*. (Csajka e Verotta, 2006).

Estes progressos foram decisivos para a formulação e implementação dos chamados modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK) que têm vindo a assumir-se como uma ferramenta cada vez mais indispensável na investigação farmacocinética e toxicocinética. Neste trabalho pretende-se fornecer uma análise do impacto da utilização dos métodos *in silico* baseados em modelos farmacocinéticos de base fisiológica na área da toxicologia.

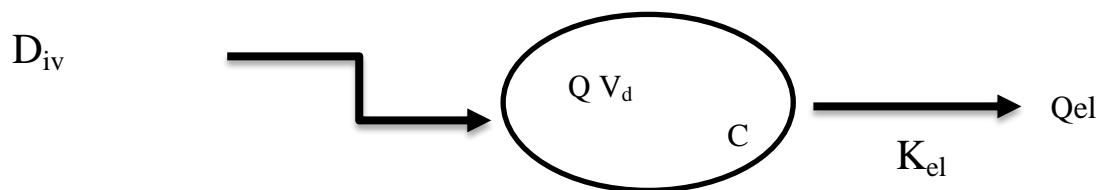
## II. Modelos Farmacocinéticos de Base Fisiológica (PBPK)

Os modelos farmacocinéticos podem classificar-se de forma hierárquica tendo em conta a sua complexidade. Os mais simples são os modelos empíricos, descritos pela soma de termos exponenciais. (Gueorguieva *et al.*, 2005). Este tipo de modelos pode ser utilizado em determinações de parâmetros farmacocinéticos primários, tais como a *clearance* e o tempo de semi-vida. (Dahl, 2009).

Os outros tipos de modelos farmacocinéticos mais comumente utilizados são os compartimentais e os de base fisiológica. Os modelos farmacocinéticos compartimentais consideram o organismo como um sistema de um ou vários compartimentos. Estes compartimentos são considerados sistemas homogêneos e o seu número, comportamento e volume não é, obrigatoriamente, estimado, segundo as características fisiológicas do organismo. (Hayes, 2001).

Os modelos compartimentais pressupõem que o fármaco se dispõe uniformemente numa fração de material biológico.

Um modelo compartimental clássico é descrito na Figura 1.



**Figura 1:** Exemplo de um modelo do tipo monocompartimental após administração de dose intravenosa. Onde  $D_{iv}$  representa a dose de fármaco administrada IV,  $K_{el}$  corresponde à velocidade de eliminação do fármaco e  $Q_{el}$  à quantidade de fármaco que é eliminada.

Na Figura 1, a forma oval representa o compartimento, que possui um determinado volume ( $V$ ). O compartimento possui, num dado instante, uma determinada quantidade de fármaco, representada pela letra  $Q$ .

Os modelos podem ainda ser classificados segundo o número de compartimentos. Na Figura 1 apresentou-se um modelo apenas com um compartimento, este tipo de modelos defende que a distribuição de fármacos é instantânea. Desta forma, o resultado da aplicação do princípio da conservação da massa ao fármaco no compartimento traduz-se pela equação seguinte: (Barreira, 2014).

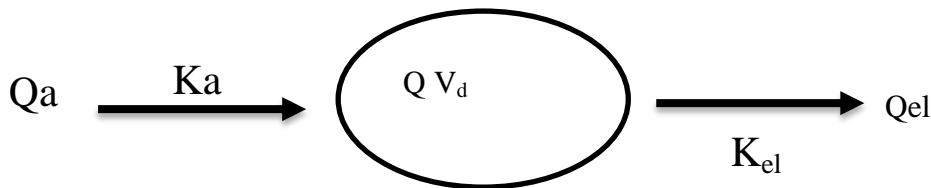
$$\frac{dQ}{dt} = -K_{el} \cdot Q$$

Ao dividir ambos os membros da equação por  $V_d$ , obtém-se:

$$\frac{dC}{dt} = -K_{el} \cdot C$$

Isto é, a taxa de variação da concentração de fármaco no compartimento é diretamente proporcional à concentração nele existente num dado instante.

Nos casos em que a administração de fármaco não é intravenosa, há um período de tempo onde o fármaco é absorvido para a corrente sanguínea. Assim, o modelo a aplicar neste caso é o que se segue (Figura 2):



**Figura 2:** Exemplo de modelo monocompartimental, onde a entrada de fármaco não ocorre de forma instantânea.

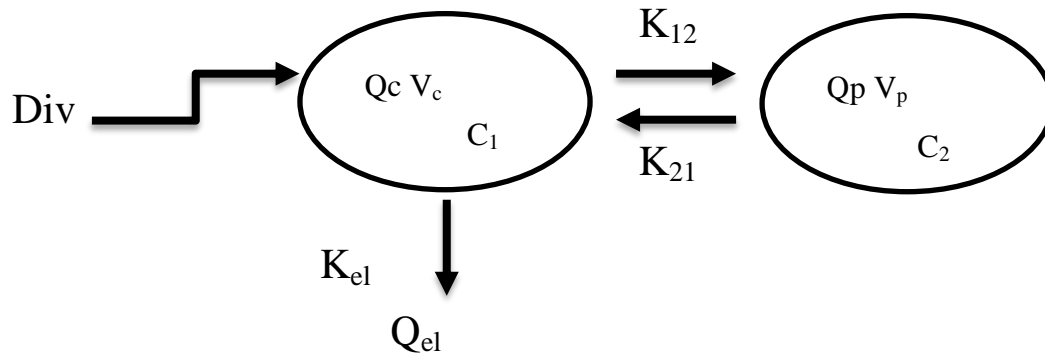
Em que,  $Q_a$  representa a quantidade de fármaco que resta no local de absorção após a administração.  $K_a$  é a constante de absorção, à partida, de primeira ordem. (Berrozpe *et al.*, 2000). Deste modo, a variação da quantidade de fármaco no organismo é traduzida pela equação seguinte:

$$\frac{dQ}{dt} = k_a \cdot Q_a - K_{el} \cdot Q$$

Na qual,  $k_a \cdot Q_a$  é a velocidade de absorção do fármaco e  $K_{el} \cdot Q$  a velocidade de eliminação.

Para determinados fármacos, pode ser indispensável considerar mais compartimentos.

Um modelo bicompartimental é o que, tendo em conta a complexidade, se segue ao monocompartimental. Este tipo de modelo é apresentado na Figura 3:



**Figura 3:** Exemplo de modelo bicompartimental após uma administração IV.

Sendo que, neste modelo, o compartimento número 1 ( $C_1$ ) representa os tecidos nos quais o equilíbrio na distribuição dos fármacos é rapidamente atingido e, o compartimento número 2 ( $C_2$ ) simboliza os tecidos nos quais a distribuição demora mais tempo até que se atinja o equilíbrio.

Em  $C_1$   $Q_c$  representa a quantidade de fármaco e  $V_c$  o volume do compartimento. Em  $C_2$   $Q_p$  corresponde à quantidade de fármaco nesse compartimento.  $V_p$  simboliza o volume,  $k_{12}$  a constante de distribuição de fármaco do compartimento 1 para o compartimento 2,  $k_{21}$  corresponde à constante de retorno do compartimento 2 para o 1 e  $k_{el}$  à constante de eliminação do fármaco.

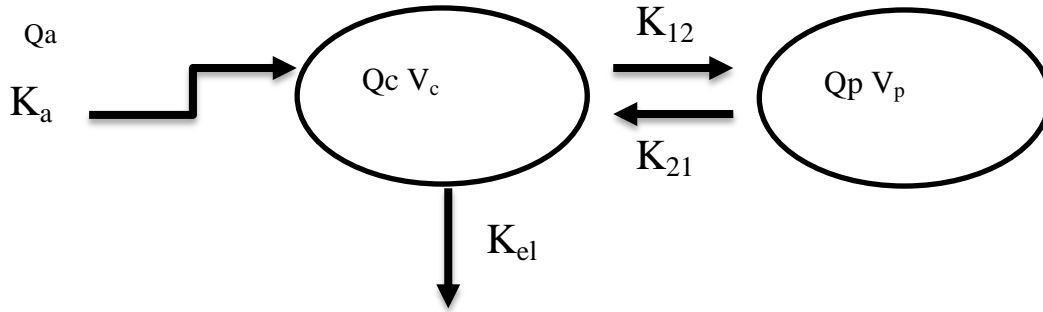
A variação da quantidade de fármaco no primeiro compartimento é descrita segundo a equação seguinte:

$$\frac{dQ_c}{dt} = K_{21} \cdot Q_p - K_{12} \cdot Q_c - K_{el} \cdot Q_c$$

As incógnitas  $Q_p$  e  $Q_c$  não permitem que esta equação possa ser resolvida de forma isolada, por conseguinte, torna-se indispensável a equação de balanço do segundo compartimento. Assim, o modelo bicompartimental é matematicamente representado por um sistema de duas equações diferenciais:

$$\begin{cases} \frac{dQ_c}{dt} = K_{21} \cdot Q_p - K_{12} \cdot Q_c - K_{el} \cdot Q_c \\ \frac{dQ_p}{dt} = K_{12} \cdot Q_c - K_{21} \cdot Q_p - K_{21} \cdot Q_c \end{cases}$$

No caso de administrações extravasculares, o modelo é alterado do seguinte modo:

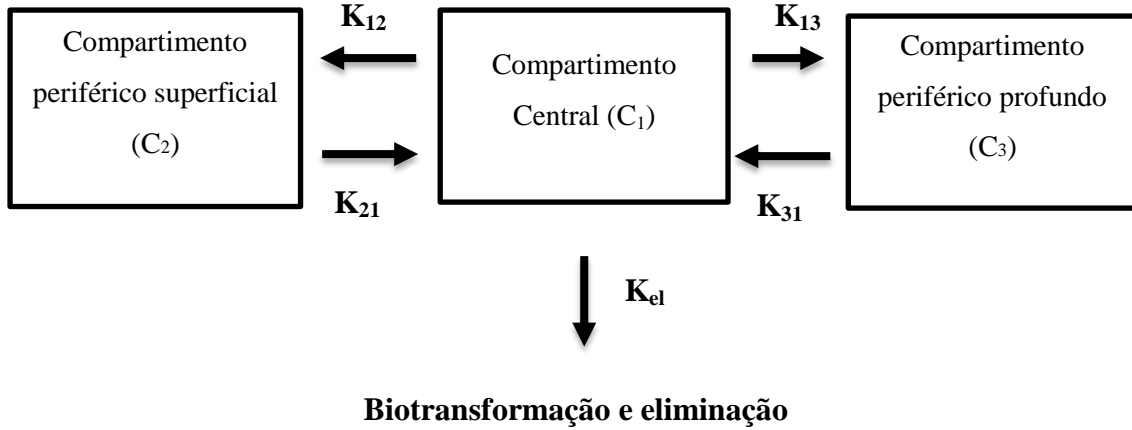


**Figura 4:** Exemplo de modelo bicompartimental onde ocorre a administração do fármaco, segundo administração extravascular com absorção de primeira ordem.

Empregando o princípio da conservação da massa ao primeiro compartimento, obtém-se a equação:

$$\frac{dQ_c}{dt} = K_a \cdot Q_a + K_{21} \cdot Q_p - K_{12} \cdot Q_c - K_{el} \cdot Q_c$$

Determinados fármacos possuem uma distribuição mais díspar no organismo, sendo que, nestes casos, o modelo tricompartmental é o mais adequado (Figura 5). Este modelo distingue-se na presença de um compartimento central e de dois periféricos. O compartimento central é constituído pelo plasma e órgãos mais irrigados, (coração, cérebro, rins, pulmões e fígado). Os compartimentos periféricos dividem-se em superficial e profundo. A partir do valor das constantes de velocidade de transferência do fármaco entre os compartimentos, como exemplificado na Figura 5, calcularam-se as razões das  $k_{21}/k_{12}$  e  $k_{31}/k_{13}$ , que propõem um rápido equilíbrio e uma transferência livre entre o compartimento central e o periférico superficial, e um equilíbrio mais lento entre o central e o profundo.



**Figura 5:** Exemplo de modelo tricompartmental aberto proposto por Kaplan *et al.* (1973) no qual as constantes  $k_{12}$ ,  $k_{13}$  representam as velocidades individuais de distribuição do diazepam do compartimento central para os periféricos, superficial e profundo, respetivamente; e as constantes  $k_{21}$  e  $k_{31}$  dos respetivos periféricos para o compartimento central.

Para calcular a quantidade de fármaco em cada um dos compartimentos é necessário resolver o seguinte sistema de três equações diferenciais: (Barreira, 2014).

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dQ_1}{dt} = K_{21} \cdot Q_2 + K_{31} \cdot Q_3 - (K_{12} + K_{13} + K_{el}) \cdot Q_1 \\ \frac{dQ_2}{dt} = K_{12} \cdot Q_1 - K_{21} \cdot Q_2 \\ \frac{dQ_3}{dt} = K_{13} \cdot Q_1 - K_{31} \cdot Q_3 \end{array} \right.$$

Os modelos compartimentais subdividem-se ainda em modelos cinéticos lineares e não lineares. Os modelos cinéticos lineares respondem a uma cinética de primeira ordem, ou seja, existe uma proporcionalidade direta entre as velocidades de reação/transferência do fármaco com a quantidade/concentração de fármaco. Deste modo, os parâmetros farmacocinéticos não se alteram quando há variações na dose. Por outro lado, os modelos cinéticos não lineares são dependentes da dose, isto é, sempre que há variações na dose, observa-se uma alteração nos parâmetros farmacocinéticos, logo a concentração não é diretamente proporcional à dose. (LeBlanc, 1997).

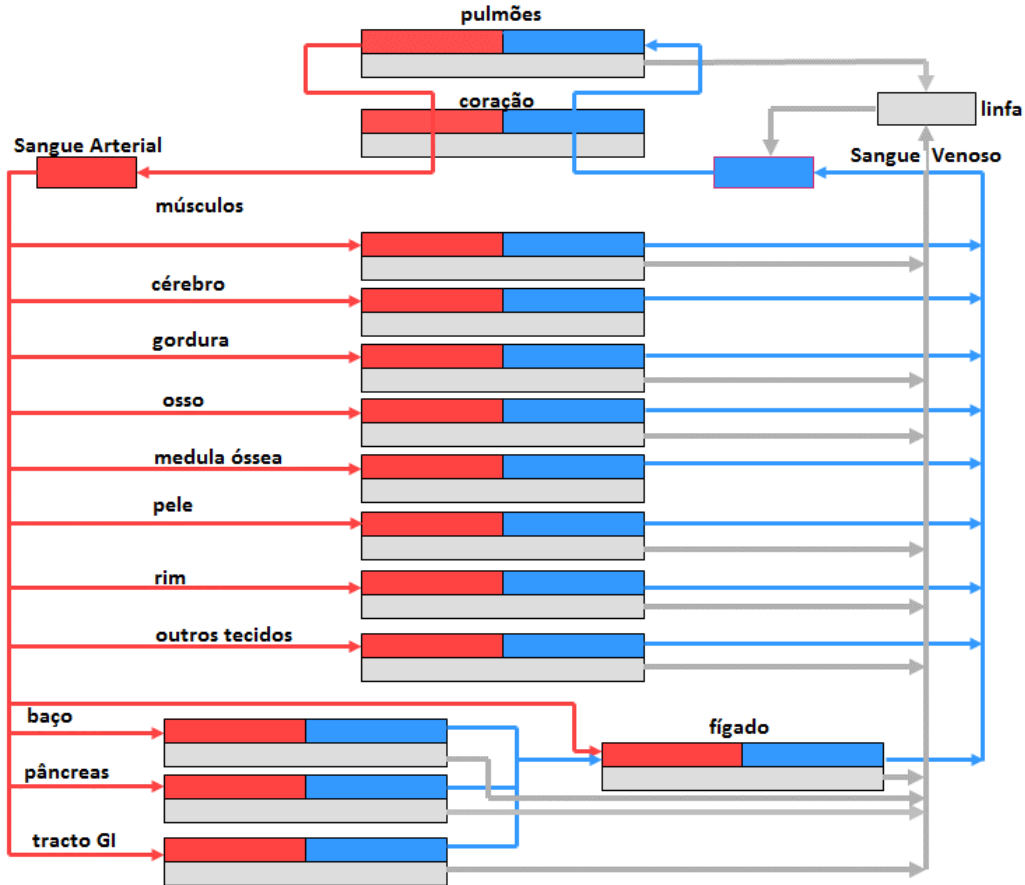
Uma vez que os parâmetros usados nestes modelos são geralmente desprovidos de uma interpretação fisiológica, os modelos farmacocinéticos compartimentais não se utilizam em estudos de extrapolação. (Hayes, 2001).

Para que seja possível a utilização destes modelos para descrever o comportamento farmacocinético de um composto químico administrado em várias doses e utilizando várias vias de administração, é requerida uma extensa experimentação em animais, de modo a conseguir gerar os dados necessários para prever o comportamento da molécula sob as respetivas condições. (Krishnan e Andersen *in* Hayes, 2001; Gueorguieva *et al.*, 2005).

A principal desvantagem dos modelos compartimentais reside no facto dos compartimentos não corresponderem a entidades anatómicas ou fisiológicas exatas. Como tal não permitem calcular a concentração do princípio ativo ou agente tóxico em todos os órgãos ou tecidos dado que, para isso é necessário conhecer certas características anatomofisiológicas, como a dimensão do órgão, o seu débito sanguíneo, a permeabilidade das membranas e a afinidade do princípio ativo pelo tecido. Reunidas estas e as características físico-químicas do princípio ativo, é possível elaborar um *modelo farmacocinético fisiológico* que englobe tantos compartimentos quantos os órgãos ou tecidos por onde o princípio ativo se distribui. (Barreira, 2014).

O desenvolvimento dos modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK) envolve uma série de etapas que se encontram interrelacionadas entre si, iniciando por representação do modelo, parametrização, simulação e validação. (Krishnan e Andersen *in* Hayes, 2001).

Estes modelos descrevem o corpo humano como uma série de compartimentos, correspondentes a órgãos e tecidos específicos, como o coração, fígado, cérebro, ossos, músculos, pulmões ou outros. Entre cada compartimento, o transporte das substâncias é feito através dos fluidos fisiológicos, como sangue ou a bÍlis, ou através da difusão. O modelo PBPK genérico é apresentado na Figura 6. (Bois, Jamei e Clewell, 2010).



**Figura 6:** Estrutura geral de um modelo PBPK para um mamífero.

Cada compartimento é definido através do volume de um tecido e pela sua taxa de fluxo sanguíneo, que é específica para o organismo em estudo. (Bois, Jamei e Clewell, 2010).

A transferência de massa para um tecido pode ainda ser limitada pela taxa de perfusão ou limitada pela taxa de permeabilidade. O limite pela taxa de perfusão tende a ocorrer para moléculas lipofílicas mais pequenas que, assim, não apresentam problemas em passar as membranas, neste caso, o fluxo de sangue nos tecidos torna-se o fator limitante. O limite pela taxa de permeabilidade acontece nas moléculas polares de maior tamanho, que, por outro lado, possuem dificuldade em penetrar as membranas. Aqui, a difusão através das membranas constitui o processo limitante.

Os modelos PBPK mais utilizados em descobertas de novos fármacos assumem que o que ocorre é, normalmente, o limite pela taxa de perfusão e que, em geral, o fígado e os

rins são os principais locais onde ocorre a eliminação dos metabolitos tóxicos. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

Desta forma, os modelos PBPK descrevem as inter-relações entre os processos farmacocinéticos conhecidos, Absorção, Distribuição, Metabolização, Eliminação e Toxicidade. Durante o desenvolvimento de novos medicamentos, processos específicos de ADMET são estudados e quantificados sob condições *in vitro*. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

Além destes ensaios, são muito utilizados os modelos *in silico*, capazes de desenvolver certas ferramentas que permitem prever processos específicos de ADMET, tendo em conta as suas determinantes fisiológicas e químicas. Os registos obtidos para cada novo medicamento devem posteriormente ser avaliados em conjunto, de modo a estimar o comportamento farmacocinético. Assim, cada dado pode ser integrado nos PBPK de modo a fornecer previsões da concentração no plasma e tecidos do composto a estudar. As informações obtidas para cada nova substância, devem ser avaliadas em conjunto para que se possa estimar o comportamento farmacocinético no geral. Deste modo, cada informação pode ser integrada nos modelos PBPK de forma a simular a cinética dos tecidos e plasma segundo condições *in vivo*. (Poulin e Theil, 2002).

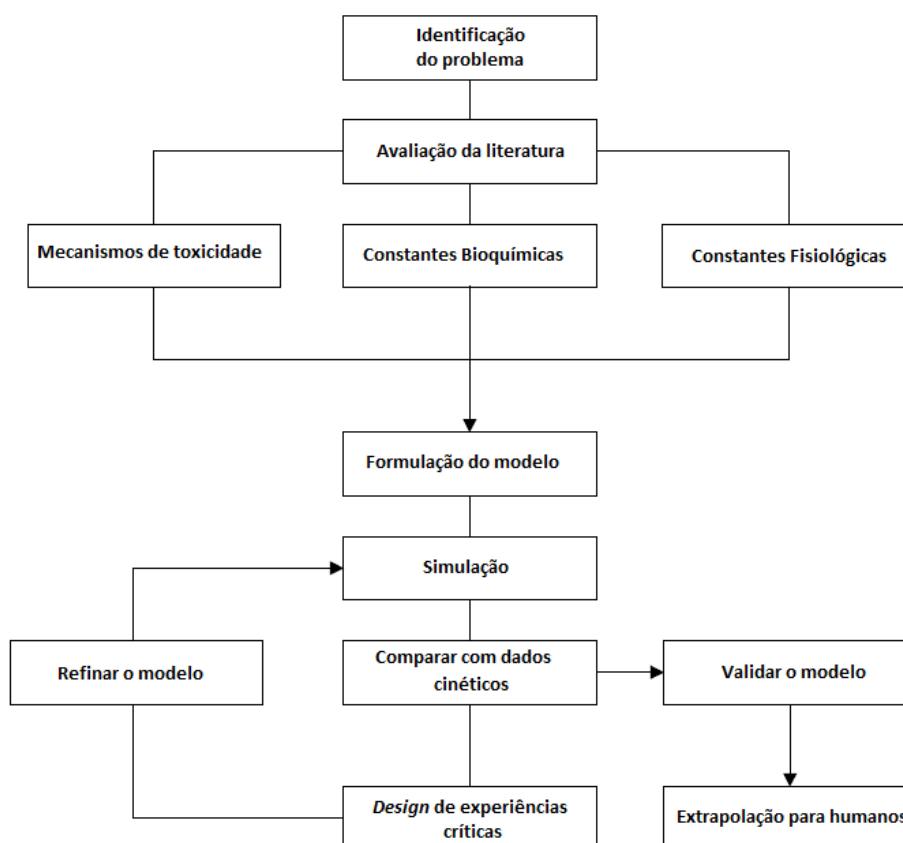
Durante o processo de desenvolvimento de um novo fármaco, os dados experimentais dos perfis de concentração ao longo do tempo, em estudos *in vivo*, podem ser usados como confirmação em ensaios *in vivo* em relação aos modelos PBPK de simulação baseados nos métodos *in silico* e *in vitro*. Consequentemente, os modelos PBPK utilizam-se como ferramentas de diagnóstico nas avaliações de ADMET de novos candidatos a medicamentos. (Poulin e Theil, 2002).

Os modelos PBPK já começaram a ser combinados com modelos de QSPR – “quantitative structure-property relationship” e modelos QSAR em testes toxicológicos, para estimar importantes parâmetros biológicos como coeficientes de partição ou constantes de taxas metabólicas. (Ekins *et al.*, 2007).

Os modelos farmacocinéticos de base fisiológica facilitam ainda a extrapolação do compartimento cinético das substâncias químicas a partir de uma dose elevada para uma dose inferior, de uma via de exposição para outra e a partir de testes em espécies animais para humanos tornando menos necessária a experimentação animal. (Krishnan e Andersen in Hayes, 2001).

## II.1. Funcionamento dos Modelos de Base Fisiológica

Como já se referiu a construção de um modelo farmacocinético de base fisiológica requer a aplicação de conhecimentos de fisiologia, bioquímica, engenharia e matemática, com vista a descrever a disposição dos compostos químicos no organismo a qualquer momento. O processo encontra-se explicado no esquema da Figura 7. (Poulin e Theil, 2002).



**Figura 7:** Esquema ilustrativo dos processos envolvidos em PBPK. Adaptado de Andersen, M. (1987). *Pharmacokinetics in Risk Assessment, Drinking Water and Health*, National Academy Press, Washington, D.C., pp. 8–23.

Para construir um modelo PBPK é necessário possuir uma quantidade considerável de dados que possam ser categorizados em três grupos: os dados do sistema (fisiológico, anatômico e bioquímico); as informações específicas sobre a substância química e a estrutura do modelo de preferência, isto é, o arranjo de tecidos e órgãos incluído no modelo. (Rowland *et al.*, 2004).

Assim sendo, os modelos PBPK constituem um sistema integrado que visa a compreensão do comportamento farmacocinético de determinado composto, bem como prever a sua concentração ao longo do tempo no plasma ou tecido. (Bois, Jamei e Clewell, 2010).

Para implementar os modelos PBPK em todo o organismo, têm sido estudadas várias estratégias. Acima de tudo, é fundamental distinguir entre modelo construído para simulação ou modelo para análise de dados. (Rowland *et al.*, 2004).

Nos modelos farmacocinéticos de base fisiológica, é primordial a identificação dos principais órgãos ou tecidos envolvidos na disposição da substância em estudo de interesse e, correlacionar com a absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade dentro desse órgão e tecido de um modo integrado e biológico viável. (Poulin e Theil, 2002).

O desenvolvimento dos modelos é iniciado através de quatro processos interrelacionados entre si, representação, parametrização, simulação e validação. A representação dos modelos envolve o desenvolvimento de descrições matemáticas dos compartimentos relevantes do organismo, bem como o tipo exposição e as vias metabólicas da substância química.

A parametrização dos modelos envolve a obtenção de medidas independentes das determinantes mecânicas, tais como parâmetros fisiológicos, físico-químicos e bioquímicos, que se encontram incluídos nas equações dos modelos PBPK.

A simulação estuda a previsão da absorção e disposição da substância em estudo, para os cenários de exposição definidos, recorrendo a um algoritmo, um programa informático e um computador.

A validação compara as previsões estabelecidas dos modelos PBPK com os dados experimentais obtidos de forma a validar a descrição do modelo. (Hayes, 2001).

É formulada uma série de equações representando todos os compartimentos interligados, para que seja possível expressar segundo um modelo matemático, o sistema biológico. (Yang *et al.*, 2004).

Essas equações assumem que o composto químico se distribui homogeneamente nos tecidos e no plasma segundo difusão passiva, através de dois processos principais:

1. Ligação não específica aos lípidos, estimada a partir da lipofilia do composto;
2. Ligação específica reversível às proteínas existentes no plasma e tecidos.

Os principais parâmetros de entrada do composto específico são o  $pK_a$ ,  $\log D$  e  $f_{up}$ . (Jones, Gardner e Watson, 2009).

As diferentes equações podem representar as taxas de fluxo sanguíneo, o volume de determinado órgão ou outros parâmetros. Para tal, estas informações encontram-se em literatura científica publicada ou podem ser obtidas através de ensaios *in vitro*.

Um importante parâmetro no desenvolvimento dos modelos farmacocinéticos de base fisiológica é a *clearance* (CL). A CL humana é muitas vezes prevista a partir de espécies pré-clínicas utilizando uma escala alométrica. Isto pode ser conseguido através dos ensaios pré-clínicos realizados para múltiplas espécies. Os modelos PBPK assumem que as diferenças da CL através das espécies podem ser previstas, tendo em conta as diferenças de peso corporal.

Na obtenção do valor da CL *in vivo* a partir do valor *in vitro*, o primeiro passo é obter o valor da *clearance* intrínseca ou  $CL_{int}$ , através dos dados do microssoma ou hepatócitos. Após a conversão da  $CL_{int}$  *in vitro* para a *in vivo*, o valor de  $CL_{int}$  é usado em conjunto com os dados obtidos para o sangue e para o fluxo sanguíneo hepático dentro de um modelo de fígado. Os modelos de fígado mais usados nesta determinação são o modelo perfeitamente agitado, o modelo do tubo paralelo e o modelo de dispersão. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

A previsão da *Clearance* renal ( $CL_R$ ) é normalmente obtida através da informação recolhida nos ensaios pré-clínicos *in vivo*. Nenhum modelo *in vitro* permite a obtenção da  $CL_R$ . Assim, são muito usadas as escalas alométricas a partir de uma ou de várias espécies. Quando um composto sofre *clearance* exclusivamente a partir da filtração

glomerular e não volta a ser reabsorvido ou submetido a processos ativos de absorção, a  $CL_R$  pode ser prevista a partir da taxa de filtração glomerular e da ligação às proteínas plasmáticas. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

Por conseguinte, a estrutura geral dos modelos PBPK pode ser aplicada a qualquer mamífero, o que permite que a mesma estrutura pode aproximadamente, ser usada para um humano ou rato. (Bois, Jamei e Clewell, 2010).

## II.2. Representação Matemática

Esta fase envolve o desenvolvimento de expressões matemáticas capazes de:

- Quantificar as inter-relações entre as determinantes mecánísticas das funções de cada compartimento de tecido;
- Prever a inter-relação entre os tecidos individuais.

A representação funcional dos modelos PBPK requer conhecimentos avançados de cálculo. Após a caracterização físico-química, fisiológica e bioquímica estar concluída, inicia-se o desenvolvimento das descrições matemáticas dos vários compartimentos de tecidos.

Nos modelos PBPK, cada compartimento de tecido é descrito através de uma equação diferencial que traduz a aplicação do princípio de conservação da massa, que consiste numa série de termos de *clearance* como o seguinte:

$$\frac{dA_t}{dt} = Cl_u Cl_a - Cl_e Cl_{vt} - Cl_m C_a - Cl_f Cl_u$$

As unidades de cada um dos termos de *clearance* é fluxo por tempo, L/h ou mL/min.

O processo que envolve a *clearance* e que melhor se aplica a todos os modelos PBPK é o de absorção química, isto é, transferências da molécula inter- e intra-tecidos. (Hayes, 2001).

A absorção de uma molécula pelos tecidos através do sangue é descrita de acordo com a 1ª lei de *Fick*. Esta lei traduz a difusão, e indica que o fluxo de uma substância é

proporcional ao gradiente de concentração. Encontra-se descrita segundo a seguinte equação:

$$Fluxo = \frac{dC_t}{dt} = k\Delta C$$

Nos modelos que são limitados por fluxo, cada órgão é retratado com recurso a uma equação diferencial de balanço de massa, como a apresentada a seguir:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{Q}{V} \left( C_{in} - \frac{c}{k} \right)$$

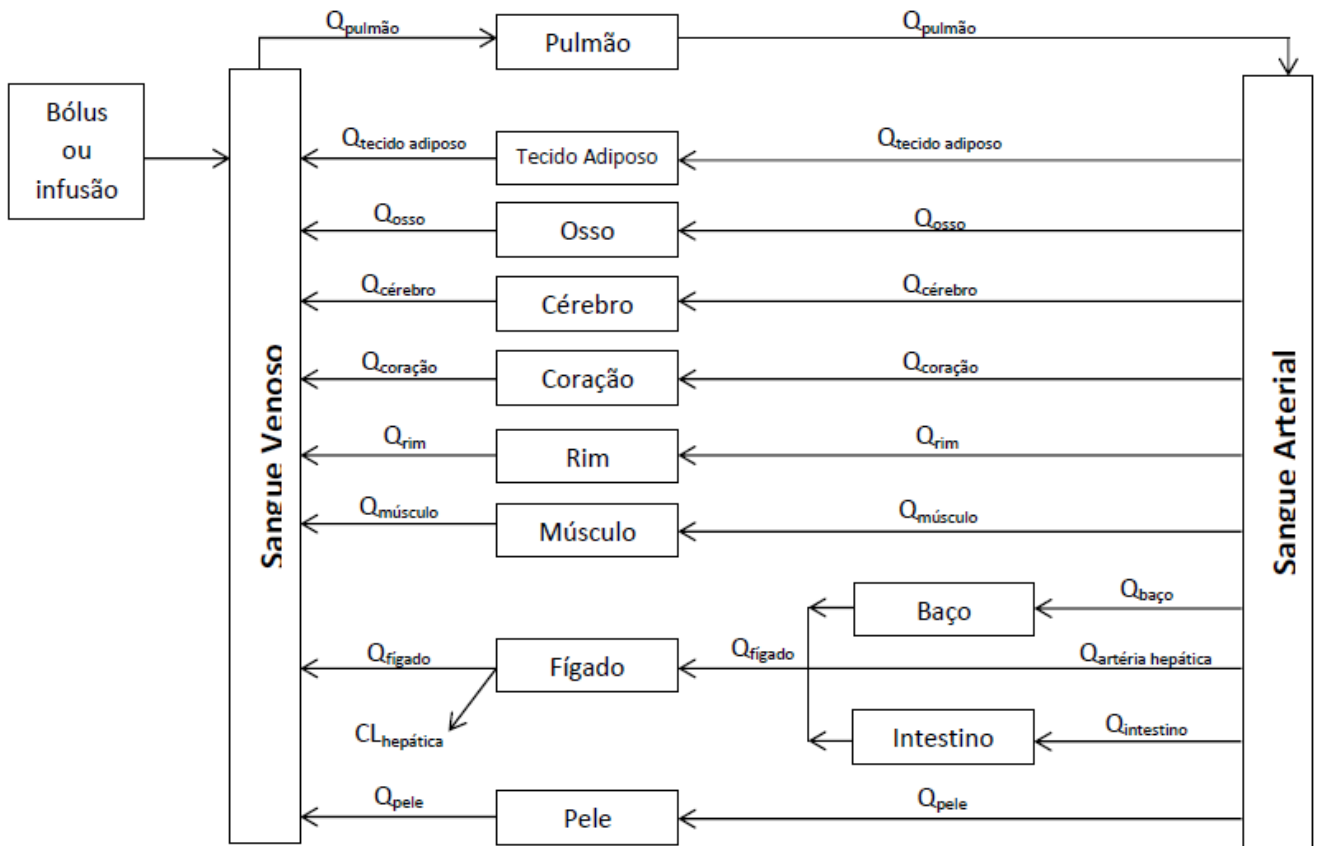
Onde C é a concentração do fármaco no compartimento homogéneo,  $C_{in}$  a concentração de fármaco do fluxo de entrada no compartimento (normalmente do sangue arterial), Q é o fluxo, V corresponde ao volume total do órgão ou tecido, e k é o coeficiente de partição do fármaco (entre o tecido e o sangue venoso). (Thompson et al., 2012).

No caso de se tratar de um órgão excretor, a equação de balanço é alterada, deste modo:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{Q}{V} \left( C_{in} - \frac{c}{k} \right) - Cl \cdot C_{in}$$

Onde o Cl representa a *clearance* do órgão excretor.

Na Figura 8 apresenta-se o exemplo de um modelo farmacocinético de base fisiológica genérico. (Poulin e Theil, 2002). Este modelo, composto por doze compartimentos, fornece informação acerca das propriedades farmacocinéticas processos de ADME que podem constituir ferramentas de estudo fundamentais para a descoberta de novos fármacos, inclusive antes dos estudos *in vivo*.



**Figura 8:** Modelo de base fisiológica de doze compartimentos proposto por Poulin e Theil.

No estudo os autores adaptaram o modelo a diferentes fármacos nomeadamente, diazepam, etoxibenzamida e propranolol. O fígado é considerado como o único sítio onde ocorre *clearance* pelo metabolismo baseado nos dados da literatura referente a este fármaco. (Poulin e Theil, 2002).

Aplicando o princípio de conservação da massa a cada compartimento e tendo em conta a forma como as moléculas são absorvidas pelos tecidos a partir do sangue, chega-se às equações diferenciais que descrevem o comportamento de cada tecido: (Barreira, 2014).

- Em tecidos onde não ocorre eliminação de fármaco:

$$\frac{dC_t}{dt} = \frac{Q_t \cdot (C_{ab} - C_{vbt})}{V_t}$$

$$C_{vbt} = \frac{C_t}{\frac{P_{t:p}}{B:P}}$$

- Tecidos onde ocorre eliminação de fármaco (fígado):

$$\frac{dC_h}{dt} = \left[ (Q_h - Q_g - Q_{sl}) \cdot C_{ab} + \frac{Q_g \cdot C_{vbg} + Q_{sl} \cdot C_{vbsl} - Q_h \cdot C_{vbh}}{V_h} \right] - \frac{[(Q_h - Q_g - Q_{sl}) \cdot C_{ab} + (Q_g \cdot C_{vbg} + Q_{sl} \cdot C_{vbsl})] \cdot E_h}{V_h}$$

- Para sangue arterial:

$$\frac{dC_{ab}}{dt} = \frac{Q_c \cdot (C_{vbl} - C_{ab})}{V_{ab}}$$

- Para os pulmões:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{Q_c \cdot (C_{vb} - C_{vbl})}{V_1}$$

- Para sangue venoso e plasma:

$$\frac{dC_{vb}}{dt} = \sum \frac{Q_t \cdot C_{vbt} - Q_c \cdot C_{vb} + K_{iv}}{V_{vb}}$$

$$C_{vp} = \frac{C_{vb}}{B:p}$$

Onde:

Q – Fluxo sanguíneo;

sl – Baço;

C – Concentração do fármaco;

l – Pulmões;

V – Volume;

c – Débito cardíaco;

E – Taxa de extração;

ab – Sangue arterial;

K – Taxa de perfusão (constante);

vb – Sangue venoso;

P<sub>t:p</sub> – Relação tecido:plasma;

vbt – Sangue venosos que sai do tecido;

B:P – Relação sangue:plasma;

vp – Plasma venoso;

t – Tecido;

$\frac{dC}{dt}$  Representa a concentração de fármaco

h – Fígado;

por unidade de tempo.

g – Intestino;

Para compostos de peso molecular elevado, a difusão é frequentemente considerada o fator limitante do processo. Nestes casos, a sua absorção através dos subcompartimentos dos tecidos, deve também ser considerada, o que requer que cada tecido e cada célula de matriz sejam descritos separadamente. (Barreira, 2014).

### **II.3. Software utilizado**

Simular um modelo PBPK implica resolver um sistema de equações diferenciais com tantas equações quanto o número de compartimentos. Não é humanamente possível resolver analiticamente este tipo de problemas matemáticos sendo necessário recorrer a resoluções numéricas que é necessário implementar em computador. Atualmente já existe *software* comercial dedicado à simulação de modelos PBPK, todavia ainda é bastante dispendioso e nem sempre é de fácil utilização.

No final do século passado, desenvolveu-se O NONMEN, um dos programas de análise amplamente utilizado e, provavelmente o mais antigo. Este programa utilizava o método dos mínimos quadrados para análise de dados de população através de linearização. (Bauer *et al.*, 2007).

Atualmente, o NONMEN continua a ser um dos programas mais utilizados nas análises de dados da população. (Bauer *et al.*, 2007). Ainda assim, existem vários outros *softwares* disponíveis, como o GastroPlus™, SimCYP Ltd, PKSIM® e o Chloepk®. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

Este tipo de programas utiliza dados de ensaios *in vitro* e *in silico*, entre os quais a solubilidade, permeabilidade, tamanho de partícula,  $\log P$ ,  $pKa$  e a dose em conjunto com os sistemas de equações diferenciais. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

### **III. Estudos Toxicológicos**

Segundo Stine e Brown (Stine e Brown, 2015) a toxicologia é a ciência que estuda os compostos tóxicos, frequentemente conhecidos como venenos. Centrando-se no estudo dos efeitos adversos desses compostos em organismos vivos.

“Todas as substâncias são venenos; não existe nenhuma que não seja veneno. A dose correta é que diferencia um veneno de um remédio.” Paracelsus.

O que Paracelsus queria transmitir é que qualquer substância em quantidade suficiente pode provocar um efeito tóxico, quer através de exposição deliberada ou não deliberada. A toxicologia foca-se, inicialmente, no estudo de substâncias capazes de causar efeitos adversos após uma exposição a uma pequena quantidade de tóxico. O conhecimento da toxicidade relativa das substâncias é fundamental em toxicologia, desde o desenvolvimento de um novo medicamento até à compreensão dos efeitos nocivos de um poluente ambiental. (Stine e Brown, 2015).

#### **III.1. Mecanismos de toxicidade**

A exposição a uma substância química pode originar efeitos colaterais, que se encontram dependentes de vários fatores, tais como a quantidade de exposição, a via de exposição ou a duração da exposição. Como tal, uma mesma substância pode provocar efeitos bem distintos em diferentes indivíduos. O mesmo acontece com os medicamentos, um fármaco pode originar benefícios e danos, tendo em conta a idade do indivíduo, a sua constituição genética, a dose do fármaco administrada e a polimedicação. Os fatores genéticos podem condicionar o modo como determinado indivíduo metaboliza ou responde a determinado fármaco. Indivíduos que possuam certas condições, como disfunção hepática ou renal, função imune deprimida ou gravidez, podem também se encontrar mais propensos a efeitos adversos. (Golan, Tashjian, e Armstrong, 2011).

Os mecanismos de toxicidade traduzem o conjunto de comportamentos ou reações através das quais a substância química produz uma resposta biológica adversa

aumentada em determinado organismo. Existem diversos mecanismos de toxicidade, tais como:

- Peroxidação lipídica: traduzida pela degradação oxidativa dos lípidos;
- Acidose: verifica-se quando o pH do sangue diminui, o que torna a respiração mais rápida e profunda, podendo mesmo tornar-se fatal;
- Teratogénese: é observada quando a exposição a determinada substância provoca danos no embrião ou feto;
- Carcinogénese: processo de formação do cancro;
- Genotoxicidade: interação da substância química com o ADN, podendo causar uma mutação genética e, por conseguinte, originar um tumor. (Golan, Tashjian, e Armstrong, 2011).

### **III.2. Testes de toxicidade**

Existem diversos métodos para testar a toxicidade de uma substância. Numa primeira instância, a observação da estrutura química fornece informações importantes acerca do comportamento da substância num organismo vivo. Por conseguinte, através da comparação com outras substâncias que possuam uma estrutura química semelhante onde a toxicidade já tenha sido avaliada e estimada. A relação entre a estrutura química e a toxicidade é conhecida como a “relação estrutura-atividade” e, a capacidade de adotar a estrutura para prever com precisão a toxicidade, acelera o processo de identificação dos produtos químicos. Os testes de toxicidade podem ainda ser realizados recorrendo aos modelos *in vitro* e *in vivo*. (Stine e Brown, 2015).

#### **III.2.1. Ensaio *in vitro***

Os ensaios *in vitro* são um tipo de ensaio realizado fora de um organismo vivo, recorrendo a sistemas celulares, tecidos ou órgãos, para por exemplo identificar agentes cancerígenos. (Stine e Brown, 2015). São sujeitos a estritas condições, controladas e adequadas e utilizando recipientes de vidro, tal como o próprio nome indica. Estes

sistemas são usados, maioritariamente, para fins de rastreio e na determinação de perfis toxicológicos. (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Porém, estes ensaios são incapazes de traduzir fielmente as condições celulares precisas de um organismo. Deste modo, os resultados obtidos neste tipo de testes podem não corresponder totalmente à realidade. (Eisenbrand *et al.*, 2002).

### **III.2.2. Ensaios *in vivo***

Nos ensaios *in vivo* os testes são realizados com recurso a um organismo vivo, ao contrário do que acontece nos *in vitro*.

Este tipo de ensaios é competente para prever o modo de ação das substâncias químicas em estudo e fornecer informações acerca de quais órgãos ou tecidos são mais afetados.

Consequentemente, os ensaios *in vivo* são mais precisos que os anteriores, o que faz com que os seus resultados sejam mais fidedignos, uma vez que permitem a observação direta do que acontece no organismo vivo. (Stine e Brown, 2015).

### **III.2.3. Ensaios *in silico***

Estes ensaios são completamente distintos dos dois anteriores, uma vez que recorrem a simulação computacional com base em modelos PBPK para obter os seus resultados. Além disso, possuem uma aplicabilidade consideravelmente superior, uma vez que os anteriores limitam a sua utilização em larga escala, são complexos, dispendiosos e requerem a presença de técnicos qualificados. (Dearden, 2003).

Contudo, existem alguns problemas no que toca aos modelos *in silico*. Antes de mais porque a toxicidade ou o efeito tóxico abrange uma vasta gama de efeitos adversos, além disso existe uma carência no que toca a dados relativos, nomeadamente, toxicidades crónicas, especialmente nos humanos.

Ainda assim, os modelos *in silico* têm vindo a ganhar reconhecimento crescente uma vez que conseguem resultados com maior exatidão que os *in vitro* ou *in vivo*.

Existe uma grande variedade de modelos *in silico*, com diferentes níveis de complexidade e capacidades de processamento. Um dos métodos mais utilizados é o

método de QSAR ou “*Quantitative structure-activity relationships*”. Trata-se de um sistema informatizado, que através da utilização de algoritmos computacionais, é capaz de gerar descritores baseados em estruturas moleculares. (Dearden, 2003).

Deste modo, o algoritmo não ambíguo é caracterizado pelo método matemático de cálculo utilizado e pelos descritores moleculares específicos necessários para a definição da equação matemática modelo. (Gramatica, 2007; Ekins, *et al.*, 2007).

Para que um modelo de QSAR possa ser utilizado, deve estar definido de forma clara, ser facilmente aplicável e de forma contínua, de modo a que os cálculos para a previsão do ponto final possam ser reproduzidos por todos os que o quiserem utilizar. (Gramatica, 2007).

A primeira fase dos estudos de ADMET em modelos computacionais iniciou-se na década de 60, utilizando métodos QSAR clássicos desenvolvidos por Hansch (1972). A simplicidade do modelo desenvolvido por Hansch fez com que as indústrias farmacêuticas o ignorassem, de certa forma, sendo que o potencial desta tecnologia só foi reconhecido anos após a sua descoberta. (Ekins, *et al.*, 2007).

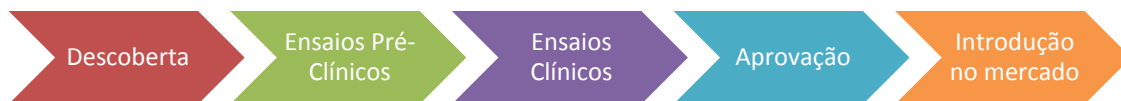
O trabalho de Hansch permitiu o reconhecimento da importância do coeficiente de partição ( $\log P$ ) como um importante indicador de toxicidade, o que permitiu, que mais tarde fosse utilizado na geração de modelos QSAR para modelar o funcionamento do citocromo P450. (Ekins, *et al.*, 2007).

No caso particular dos fármacos, os ensaios clínicos são uma ferramenta essencial para atestar a segurança e eficácia de novos medicamentos, assim como para atualizar características de medicamentos que já se encontrem no mercado.

Existem uma série de questões éticas e riscos associadas a este tipo de ensaios, por este motivo, o seu impacto em todos os participantes, quer sejam voluntários ou doentes, deve ser minuciosamente avaliado. Os potenciais benefícios resultantes da participação dos doentes, num determinado ensaio clínico, devem ser sempre superiores a qualquer risco que o ensaio possa envolver.

A pesquisa de novos fármacos requer a realização de vários ensaios controlados, a partir dos quais se avalia a segurança e eficácia dos mesmos. Estes ensaios dividem-se em várias fases, sendo que em cada fase são testados de forma distinta. Na Figura 9

encontram-se esquematizadas sucintamente todas as fases desde a descoberta da nova substância até à sua introdução no mercado. (Roche, 2015).



**Figura 9:** Esquema do processo de descoberta de um novo fármaco até ser introduzido no mercado.

### III.2.4. Fase Pré-Clínica

A primeira fase denomina-se de fase pré clínica ou fase 0. Caracteriza o momento em que a nova molécula é descoberta e se pretende caracterizar física e quimicamente, de modo a perceber qual a sua atividade farmacológica.

Em seguida, é testada a toxicidade do novo medicamento em animais, com o objetivo de desenvolver um método bioanalítico que permita avaliar a farmacocinética e a resposta à exposição.

Aquando da conclusão dos testes pré-clínicos, o fármaco encontra-se pronto para os estudos clínicos, realizados em humanos voluntários e que se denominam de ensaios de Fase I.

Estes ensaios realizam-se *in vitro*, *in vivo* ou *in silico* e, é através destes que se obtém a informação necessária para o estudo do medicamento em causa. Os mais utilizados são os *in silico* e *in vitro*, de modo a possibilitar um conhecimento mais adequado das características farmacocinéticas e toxicocinéticas da molécula, o que permite concluir se se justifica o ensaio clínico. (Roche, 2015).

### III.2.5. Fase Clínica

#### III.2.5.1 Ensaios de Fase I

Nestes ensaios espera-se avaliar com precisão a segurança, tolerabilidade e farmacocinética da molécula. Os ensaios de fase I são sujeitos a critérios rigorosos e

monitorização constante para garantir que são conduzidos de forma ética. Todos os participantes nos estudos clínicos devem assinar um consentimento informado, onde possuem o direito legal de desistir do ensaio a qualquer momento.

### **III.2.5.2. Ensaio de Fase II**

Na fase II, o ensaio clínico tem como principal objetivo garantir a eficácia do medicamento experimental no tratamento da doença em causa ou condição médica. Divide-se em duas sub-fases, IIa e IIb.

Na **fase IIa**, determina-se a dose mais eficaz, o método de administração mais adequado, bem como o tipo de forma farmacêutica, testando o fármaco num grupo de participantes ainda reduzido.

Na **fase IIb** o ensaio é alargado a um maior número de participantes, para sedimentar as conclusões obtidas na fase IIa.

Os participantes da fase II devem representar uma mancha heterogénea da população, sendo identificados por médicos em centros de investigação, clínicas ou hospitais em diferentes zonas do mundo. Estes participantes são normalmente doentes com a doença que o medicamento experimental permite tratar, sendo que não devem ter outros problemas de saúde, bem como tomar outro tipo de medicação. (Roche, 2015).

### **III.2.5.3. Fase III**

A fase III testa os resultados dos ensaios clínicos anteriores utilizando um maior número de participantes, geralmente de 1000 a 3000 voluntários com a doença. Normalmente são ensaios aleatórios e duplamente cegos, isto é, nem o investigador nem o participante sabem a quem no ensaio está a ser administrado o medicamento experimental ou um placebo. Nesta fase, testam-se as interações farmacológicas, assim, procuram-se pacientes que sofram de outras doenças e que tomem outros medicamentos, para que se avalie se a nova molécula afeta os tratamentos com outros fármacos ou não.

Estes ensaios permitem avaliar a razão risco – benefício do novo medicamento, bem como grande parte das características do mesmo.

Após a conclusão das Fases I, II e III, procede-se ao registo do medicamento através da autoridade competente para que se obtenha aprovação para a sua comercialização. Na Europa, o pedido de autorização para comercialização de um medicamento é feito à Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Para tal, fornece-se à mesma uma descrição do processo de desenvolvimento do novo fármaco com toda a informação obtida através dos ensaios pré-clínicos e clínicos através dos quais se demonstrou a eficácia e segurança. Sendo aprovado, o novo medicamento é introduzido no mercado.

#### III.2.5.4. Fase IV

Contudo, mesmo após a comercialização, são ainda realizados os ensaios de fase IV ou ensaios de pós comercialização onde se pretende recolher informação sobre o uso do medicamento a longo prazo, de forma a avaliar os benefícios e/ou riscos ao longo do tempo.

Neste caso, a população em estudo já é a população em geral, “*real life patients*”.

Assim, cabe aos profissionais de saúde, nomeadamente médico e farmacêutico, reportar às entidades competentes, INFARMED neste caso, qualquer efeito colateral indesejado que não esteja presente na bula do medicamento.

Na Tabela 1 encontra-se um resumo das diversas fases de desenvolvimento de fármacos.

	Fase Pré-Clínica	Fase Clínica			
		FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV
População alvo	Testes em laboratório e em animais	20 a 100 Voluntários Saudáveis	100 a 300 voluntários doentes	1000 a 3000 voluntários doentes	“ <i>Real life patients</i> ”
Objetivo	-Determinação da atividade farmacológica; - Avaliar a Segurança.	- Determinar a segurança, tolerabilidade e farmacocinética.	- Garantir a eficácia do medicamento experimental.	- Determinar as interações farmacológicas; - Avaliar a razão risco – benefício.	- Concluir acerca do uso do medicamento a longo prazo; - Avaliar os benefícios e/ou riscos ao longo do tempo.

**Tabela 1:** Resumo das Fases do processo de desenvolvimento de um novo fármaco.

#### **IV. Perspetiva histórica da utilização da modelação PBPK nos estudos toxicológicos**

O conceito de PBPK teve o seu desenvolvimento embrionário entre 1920 e 1940. Porém, a utilização corrente destes modelos começou no início dos anos 70, devido principalmente ao esforço feito por alguns pesquisadores com experiência em desenho de processos de engenharia química. (Yang *et al.*,2004).

Nesta fase, destacaram-se Kenneth B. Bischoff, na altura na Universidade do Texas, Austin, Texas e Robert Dedrick da *Biomedical Engineering and Instrumentation Branch*, uma divisão dos serviços de pesquisa do Instituto Nacional de Saúde em Bethesda, Mariland. Bischoff e Brown desenvolveram em 1966 o primeiro modelo matemático para simular o transporte de massa pelo sistema circulatório. Dedrick por seu lado introduziu em 1973 o conceito de “*Animal Scale-Up*” que permitiu daí em diante extrapolar, com base em equações alométricas, os resultados farmacocinéticos e toxicocinéticos, obtidos em ensaios com animais, para humanos. (Dedrick, 1973).

Segundo Dedrick os diversos processos fisiológicos e os tamanhos dos órgãos em mamíferos estão relacionados através de uma lei de potências, com o peso corporal. (Dedrick, 1973). A equação alométrica é a seguinte:

$$P = a(BW)^m$$

Onde:

P – propriedade fisiológica ou tamanho anatómico;

a = coeficiente empírico;

BW = peso corporal;

m = expoente alométrico;

Se m=1, então P é proporcional a BW;

Se m<1, o valor de P vai aumentar mais devagar que BW;

Se m>1, o valor de P aumenta mais rapidamente que BW.

Se se dividirem ambos os lados da equação por BW, tem-se:

$$\frac{p}{BW} = a(BW)^{m-1}$$

Assim, se o expoente alométrico é menor que a unidade, como observado para muitas medidas de função fisiológica, tais como o consumo basal de oxigénio ou a depuração de creatinina, a função por unidade de peso corporal diminui com o aumento do peso do corpo. (Dedrick, 1973).

Nos anos 80, dois artigos sobre modelos PBPK para o estireno e para o diclorometano despoletaram outra revolução na área dos estudos toxicológicos.

#### **IV.1. Estireno, Ramsey e Andersen, 1984**

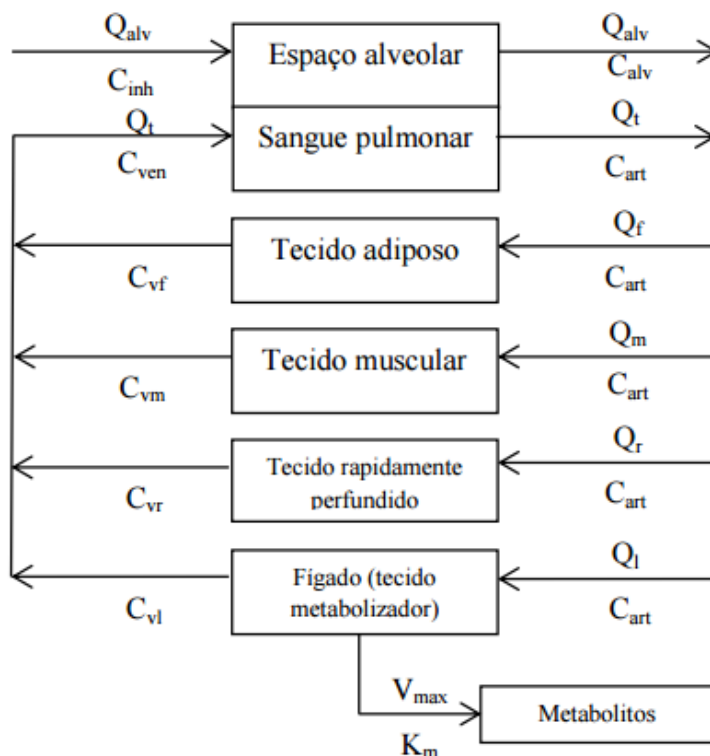
A exposição a estireno provoca depressão do sistema nervoso central, irritação da pele, olhos e trato respiratório superior. O composto é extremamente volátil o que faz com que seja rapidamente absorvido após a inalação ou o contacto com a pele.

Também pode ocorrer exposição ocupacional, o que se pode verificar durante o seu fabrico, transporte ou polimerização. A ingestão via oral não constitui um risco ocupacional significativo.

O estudo de Ramsey e Andersen (Ramsey e Andersen, 1984) utilizou um modelo farmacocinético de base fisiológica, com o objetivo de relacionar o comportamento do estireno inalado em ratos com o estireno inalado por seres humanos.

O modelo utilizado consistia numa série de equações diferenciais que quantificavam a concentração de estireno ao longo de tempo, em quatro tecidos diferenciados (Figura 10):

1. Órgãos altamente perfundidos;
2. Tecidos moderadamente perfundidos (músculo, tecido adiposo);
3. Perfundido lentamente;
4. Órgãos com elevada capacidade de metabolização do estireno, nomeadamente no fígado.



**Figura 10:** Modelo farmacocinético utilizado para simular o comportamento do estireno inalado.

O compartimento pulmonar do modelo incorpora a captação de estireno controlada por taxas de ventilação e perfusão e sangue através do coeficiente de partição do ar. O grupo de tecidos de metabolização utiliza o modelo de Michaelis-Menten controlado segundo as constantes de  $v_{max}$  e  $K_m$ .

Utilizando um único conjunto de constantes fisiológicas e bioquímicas, o modelo foi capaz de simular as concentrações de estireno no sangue e gordura, de ratos expostos a 80, 200, 600, ou 1200 ppm de estireno. (Ramsey e Andersen, 1984).

As constantes utilizadas na simulação do estireno em ratos, foram utilizadas em conjugação com relações alométricas para obter as constantes correspondentes para o organismo humano.

O estudo de Ramsey e Andersen permitiu concluir que:

- O comportamento simulado de estireno é particularmente sensível a alterações nas constantes que descrevem o grupo do tecido adiposo, e para a taxa metabólica máxima descrita por  $V_{m\acute{a}x}$ ;
- O metabolismo do estireno encontra-se em modo de saturação para concentrações inaladas acima de, aproximadamente, 200 ppm em ratinhos, ratos e seres humanos;
- Em concentrações de inalação inferiores a 200ppm, a razão de concentração de estireno no sangue/ar inalado é controlada pelo metabolismo limitado de perfusão;
- Em concentrações superiores a 200ppm inalados, a proporção é controlada pelo sangue e, não está linearmente relacionada com a proporção obtida em concentrações mais baixas de exposição;

Assim, segundo os resultados, conclui-se que através dos modelos farmacocinéticos de base fisiológica é possível:

- Estabelecer uma razão entre a concentração sanguínea e a concentração de ar de um produto químico inalado;
- Extrapolar esta relação obtida através de estudos em animais para seres humanos.

#### **IV.2. Diclorometano, Andersen *et al.*, 1987**

A utilidade dos modelos farmacocinéticos de base fisiológica na redução das incertezas associadas às relações dose elevada/dose baixas e extrapolação inter-espécies, foi demonstrada durante as avaliações de risco para várias substâncias químicas. Este aspeto foi demonstrado inicialmente para o diclorometano (DCM).

Sabia-se que o DCM causava tumores do pulmão e do fígado a ratinhos expostos a 2000 ou 4000ppm, seis horas por dia. (Hayes, 2001).

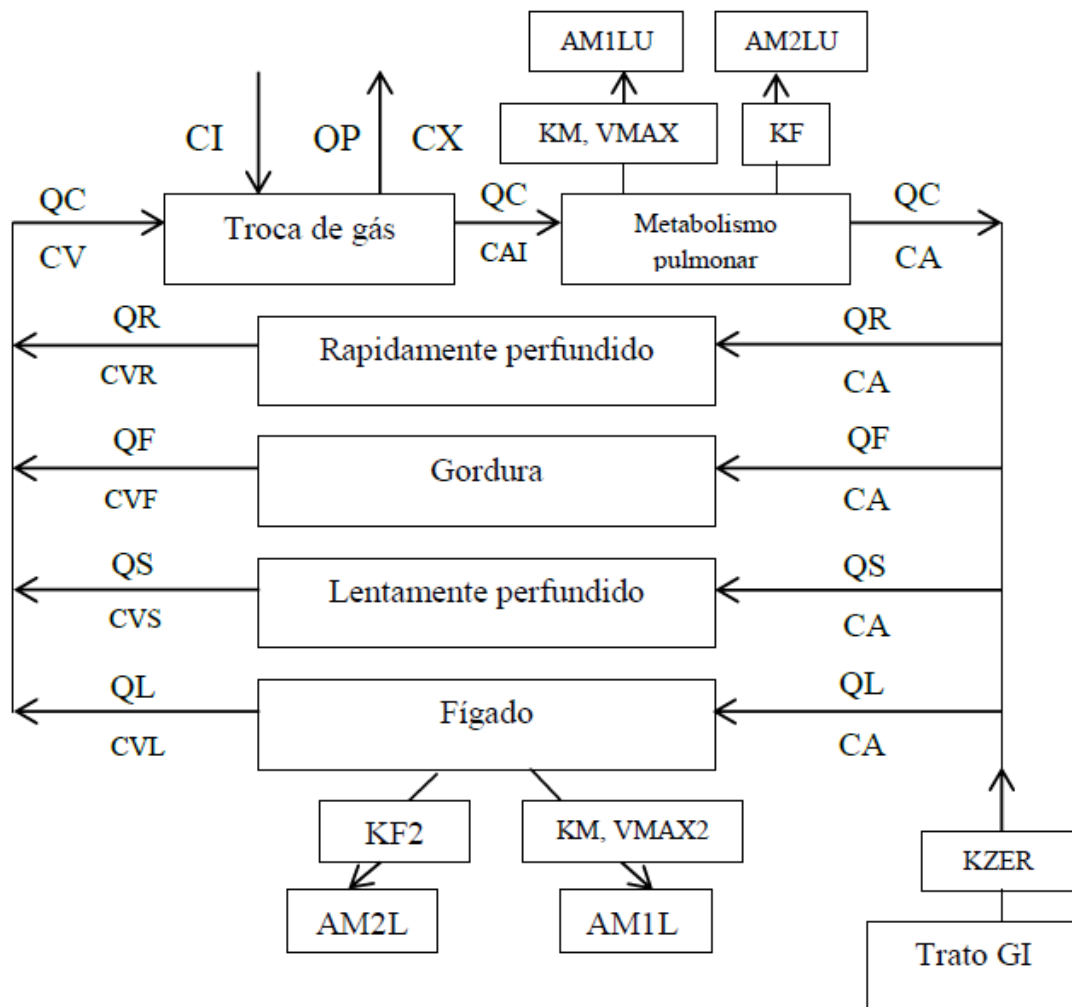
Também se sabia que o DCM é metabolizado através de dois processos:

1. Oxidação, o que conduz à produção de cloreto de formilo altamente reativo, assim como de monóxido de carbono e pequenas quantidades de dióxido de carbono;

2. Conjugação com glutathione (GSH), produzindo clorometilglutathione, um intermediário reativo e dióxido de carbono. (Andersen *et al.*, 1987).

Além dos metabólitos reativos resultantes da oxidação ou da conjugação com a glutathione, podem verificar-se mudanças mutagénicas o que podem levar a cancro. (Hayes, 2001).

No modelo PBPK estabelecido para o DCM, estas vias metabólicas foram descritas de acordo com as suas características cinéticas. (Figura 11). O metabolismo do diclorometano nos pulmões e no fígado foi descrito com recurso a um modelo de saturação para a oxidação e a um termo linear para a reação com a glutathione. (Andersen *et al.*, 1987; Hayes, 2001).



**Figura 11:** Diagrama do modelo PBPK utilizado para o DCM.

#### **IV.2.1. Extrapolação Dose-baixa/Dose-alta**

A previsão da dose no tecido alvo da conjugação do DCM com a GSH por extrapolação linear dá origem a uma estimativa 21 vezes mais elevada do que a obtida por modelos usuais de base fisiológica. Supõe-se que esta discrepância surge devido ao comportamento não linear do metabolismo do DCM quando exposto a elevadas concentrações. Em concentrações acima dos 300ppm, a oxidação mediada pela via de oxidação do citocromo P450 fica saturada, o que provoca um aumento desproporcional no fluxo através da via de conjugação da GSH. (Andersen *et al.*, 1987).

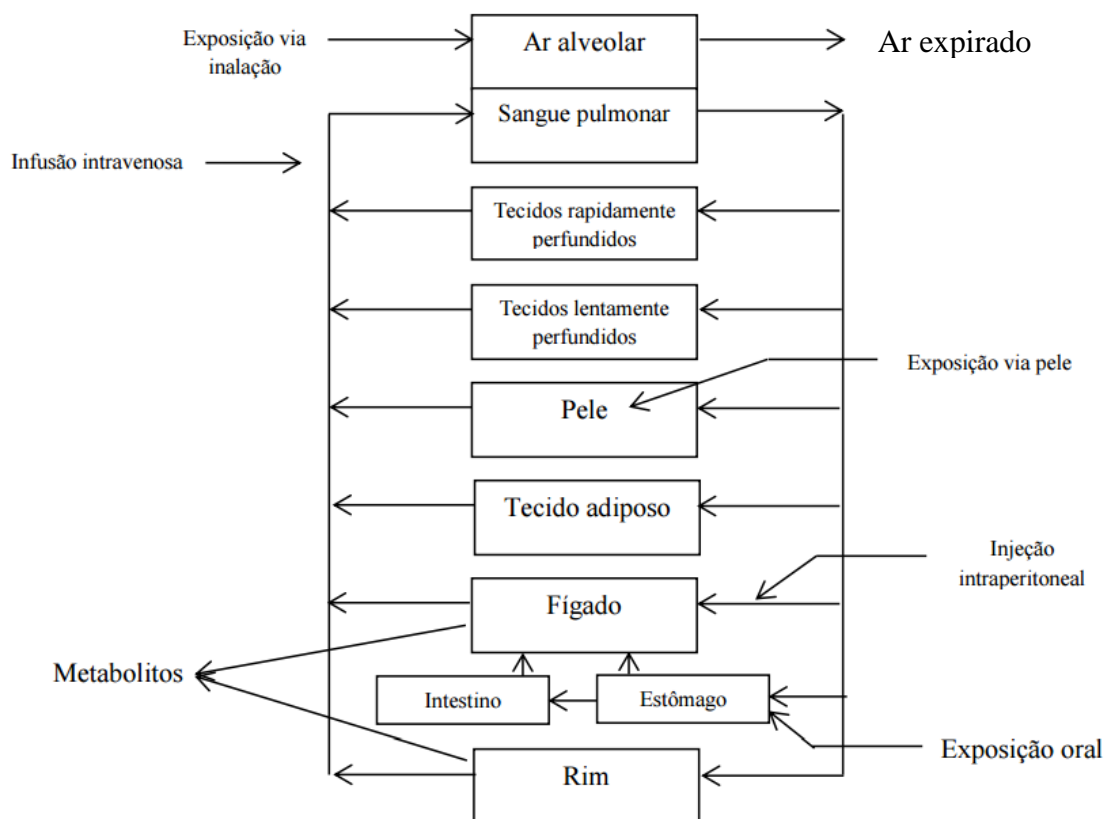
#### **IV.2.2.Extrapolação inter-espécies**

Os parâmetros fisiológicos nos modelos PBPK do rato foram determinados experimentalmente. A extrapolação do comportamento do DCM em humanos foi possível a partir desses parâmetros. Os modelos PBPK simularam os níveis de DCM no sangue observados em humanos ao fim de uma exposição de 100 ou 200 ppm, após 6 horas de inalação de DCM. A dose de tecido alvo para humanos foi estimada em cerca de 2,7 vezes mais baixa que a dose estimada para o rato. Quando consideradas em conjunto, a dose de conjugados DCM-GSH em tecidos humanos, associadas a uma exposição de 6 horas a uma concentração de 1ppm é 57 vezes mais pequena que a esperada com recurso a extrapolação linear do seu comportamento quando exposto a elevadas concentrações. (Hayes, 2001).

#### **IV.3. Corley *et al.*, 2000**

Corley *et al.* estudou a exposição ao clorofórmio através da água do banho. O clorofórmio é um potente anestésico que é muito tóxico quando os seus vapores são inalados. A principal fonte de exposição humana ao clorofórmio ocorre através da água, em consequência da utilização de processos de cloração nos tratamentos da água.

O estudo de Corley e colaboradores utilizou de um modelo PBPK com 9 compartimentos (Figura 12).



**Figura 12:** Descrição da disposição do clorofórmio em ratos, ratinhos e humanos através de inalação, exposição via oral, injeção intraperitoneal, infusão intravenosa e exposição através da pele.

Verificou-se um aumento significativo no clorofórmio inalado e, conseqüentemente na biodisponibilidade, quando os voluntários se encontravam expostos a subidas de temperatura entre os 30 e 40°C. A temperaturas mais elevadas, a quantidade de clorofórmio inalado era 30 vezes maior do que a temperaturas mais baixas. Isto acontece uma vez que a baixas temperaturas o fluxo sanguíneo diminui, ou seja, a elevadas temperaturas as quantidades de clorofórmio inaladas são consideravelmente superiores.

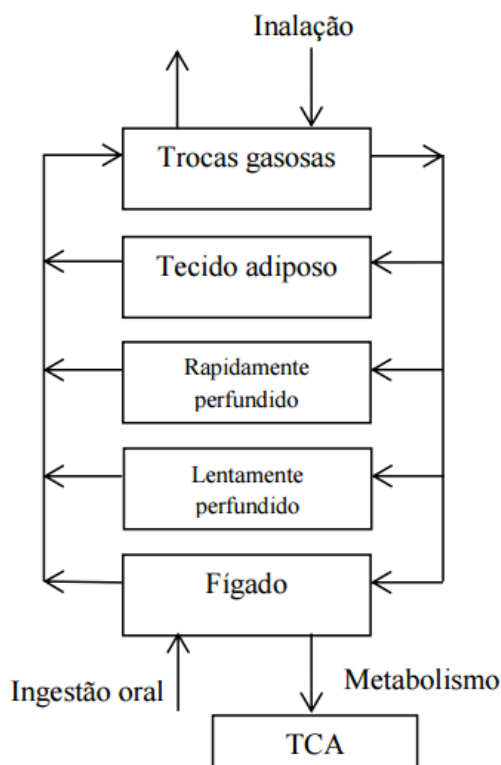
Para temperaturas entre os 30 e os 35°C, os voluntários do sexo masculino inalaram mais clorofórmio que as voluntárias femininas, o que resulta num coeficiente de permeabilidade da pele ( $K_p$ ) menor para estas.

A contribuição relativa da absorção dérmica de clorofórmio para o total de cargas corporais associadas com o banho durante 30 minutos foi previsto ir de 1 a 28%, dependendo da temperatura da água do banho. (Corley *et al.*, 2000).

#### **IV.4. Fisher, 2000**

O tricloroetileno ou TCE constitui atualmente um contaminante ambiental generalizado nos Estados Unidos, devido ao seu uso histórico como um desengordurante na década de 1960 e 1970. A farmacocinética do TCE tem sido estudada com recurso a testes em animais e humanos desde há mais de trinta anos. O modelo PBPK que tem sido utilizado para estudar os processos de ADMET do TCE, bem como a produção, distribuição, metabolismo e eliminação dos seus metabolitos é apresentado na Figura 13. O tricloroetileno é facilmente absorvido para a corrente sistémica através da via oral ou por inalação e é rapidamente metabolizado pelo citocromo P450 do fígado e, em muito menor grau, conjugado com a glutathiona. O principal metabolito responsável por induzir cancro em ratinhos é o ácido tricloroacético (TCA). (Fisher, 2000).

Nos últimos 10, verificaram-se avanços significativos na compreensão da dosimetria do TCE, bem como dos seus metabolitos em ratinhos e em pessoas. Estes avanços, em parte decorrentes da utilização de modelos PBPK no estudo da ADMET da molécula, podem ser utilizados atualmente, como dados fundamentais para decidir questões de saúde pública relacionadas com o TCE. (Fisher, 2000).



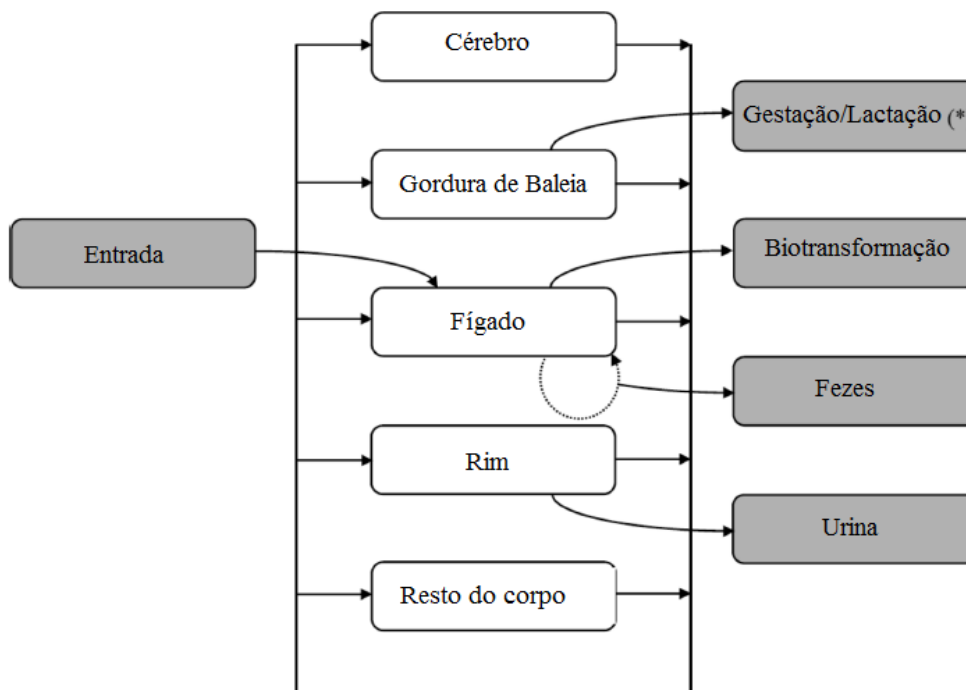
**Figura 13:** Modelo PBPK de primeira geração utilizado no estudo do TCE e do seu metabolito oxidativo em ratos e em humanos. O TCE é inalado ou ingerido através da água e nos ratinhos é administrado por uma sonda/bólus oral. O TCE distribui-se pelos compartimentos corporais e ou é metabolizado no fígado para TCA ou expirado.

#### IV.5. Weijjs *et al.*, 2010

Weijjs *et al.* desenvolveram um modelo PBPK para o efeito do composto da classe dos bifenil policlorados mais resistentes, usualmente conhecido como *polychlorinated biphenyl* (PCB 153), em fêmeas e machos de “Toninha-comum” (*Phocoena phocoena*) um cetáceo encontrado nas águas frias do hemisfério Norte. Esta espécie é muito suscetível à poluição, isto devido às suas capacidades metabólicas, longa vida útil e posição de topo na cadeia alimentar marinha.

O modelo utiliza um conjunto de 5 compartimentos, fígado, rim, gordura de baleia, cérebro e um compartimento que representa o resto do corpo, todos ligados por meio de

sangue (Figura 14). O estudo teve como objetivo clarificar os processos de ADMET do cetáceo, relativamente à sua exposição a PCB 153. (Weijs *et al.*, 2010).



**Figura 14:** Modelo PBPK para o PCB 153 em machos e fêmeas de *Phocoena phocoena*. (\*) – Somente aplicado às fêmeas.

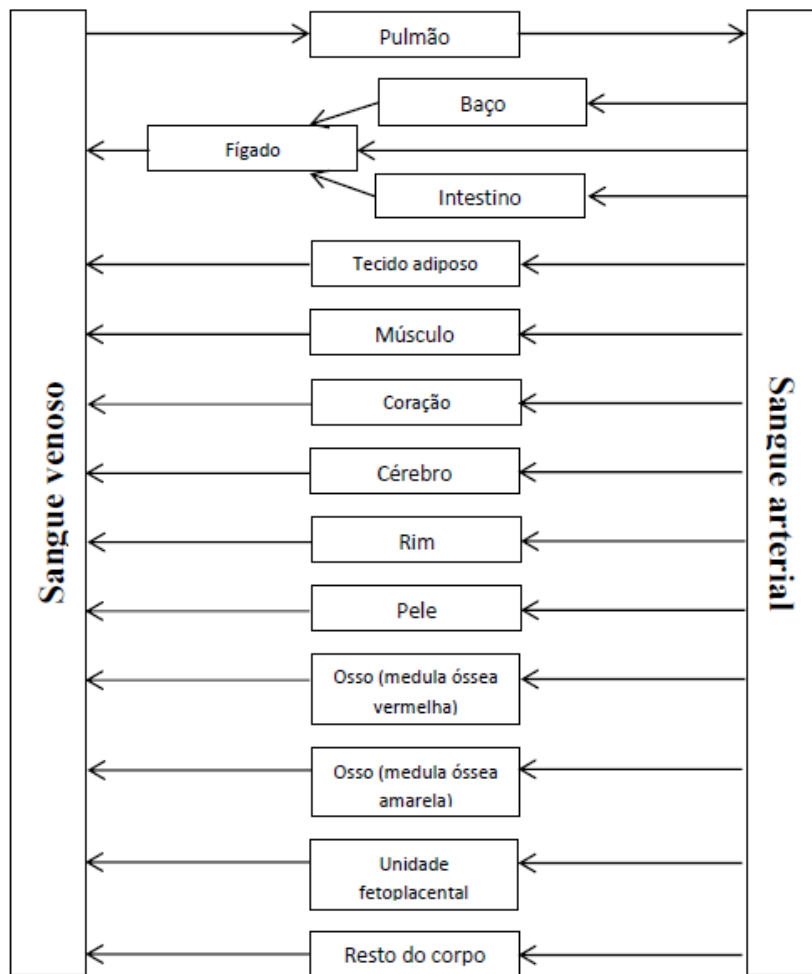
O estudo revelou que as concentrações de PCB153 em machos diminuíram com a idade, o que sugere que com o passar dos anos, a transformação metabólica pode representar uma possível via de eliminação. Os modelos PBPK utilizados permitiram simular a bioacumulação de PCB 153 durante todo o tempo de vida da espécie de *Phocoena phocoena*, o que corresponde a aproximadamente 20 anos.

O estudo demonstrou ainda que existe uma distribuição específica de PCB 153 no organismo do cetáceo, nomeadamente no fígado, cérebro ou rins. Através deste estudo demonstrou-se que é possível biomonitorizar os mamíferos marinhos selvagens. (Weijs *et al.*, 2010).

#### IV.6. Xia *et al.*, 2013

Xia *et al.* propôs um modelo PBPK simples e de fácil implementação, envolvendo vários parâmetros fisiológicos relacionados com a gravidez, com o objetivo de caracterizar a farmacocinética de alguns medicamentos de referência (metformina, dioxina, midazolam e emtricitabina) (Figura 15).

Durante a gravidez, a farmacocinética de um fármaco pode ser alterada, deste modo, torna-se primordial uma identificação prévia de potenciais alterações nos efeitos provocados pelos fármacos. Os modelos farmacocinéticos de base fisiológica têm sido utilizados para prever essas alterações em mulheres grávidas, com base em alterações fisiológicas que podem influenciar a metabolização e eliminação do fármaco. Trata-se de um estudo comparativo que estuda a farmacocinética destes fármacos entre mulheres não grávidas e em mulheres após o parto. (Xia *et al.*, 2013).



**Figura 15:** Modelo PBPK proposto por Xia *et al.*

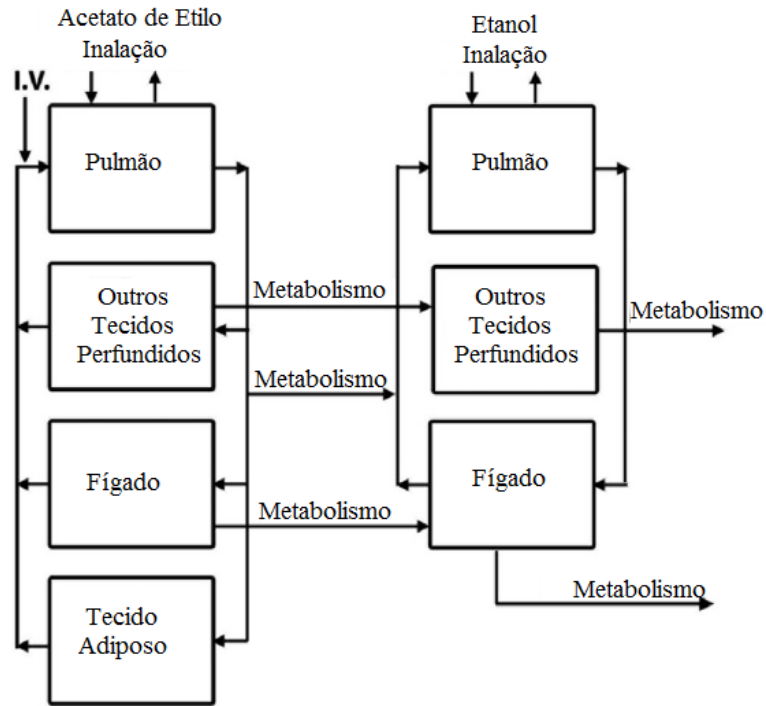
Através deste modelo foi possível prever a farmacocinético dos compostos estudados, quando em comparação com as observações clínicas. O modelo pode ainda ser implementado em GastroPlus, sendo que é aplicável para outros medicamentos com *clearances* semelhantes nas várias fases de desenvolvimento de novos medicamentos, com vista a perceber se se verificam alterações farmacocinéticas em populações de grávidas, tendo por base dados de voluntários saudáveis. (Xia *et al.*, 2013).

#### **IV.7. Crowell *et al.*, 2015**

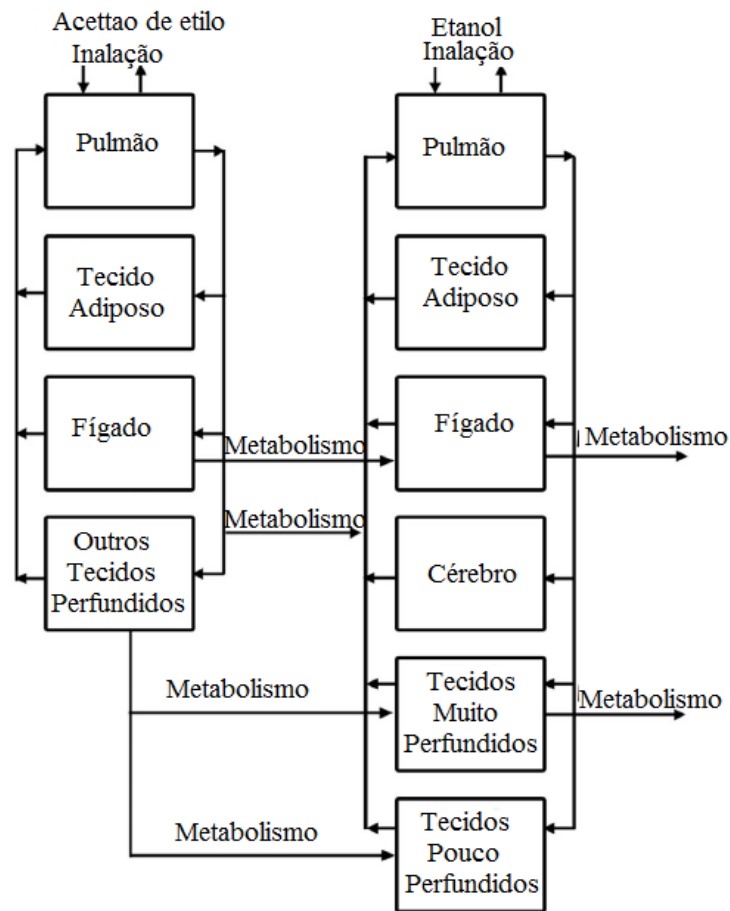
O acetato de etilo e os seus metabolitos etanol, acetaldeído, e o ácido acético são uma família de compostos relacionados metabolicamente e com uma variedade de aplicações industriais, tais como solventes, substratos e produtos intermédios. A exposição humana ao composto “pai” (o acetato) leva a uma exposição sistémica aos seus três metabolitos sequenciais, assim como uma exposição a etanol conduz a uma exposição aos seus dois metabolitos sequenciais, e assim por diante. No caso do acetato de etilo, a principal via de exposição humana que preocupa as indústrias químicas é a inalação, por outro lado, a exposição a etanol é maioritariamente devida à ingestão por via oral.

Crowell *et al.* desenvolveram um estudo tendo como base a exposição ao acetato de etilo, através das vias intravenosa e oral, para estudar a farmacocinética e toxicocinética do acetato de etilo e do etanol no rato.

Foi desenvolvido um modelo PBPK para os dois membros exógenos das séries etilo, acetato de etilo e etanol. Os resultados foram posteriormente extrapolados para humanos (Figuras 16 e 17).



**Figura 16:** Modelo PBPK no rato.



**Figura 17:** Modelo PBPK para o humano.

O modelo PBPK utilizado foi capaz de reproduzir com sucesso a cinética do acetato de etilo e do etanol no sangue, proveniente de administração IV e inalação em ratos e a cinética do etanol, resultante da inalação, em humanos. A inalação de etanol nos ratos indicou uma leve sedação, detecção de odor, diminuição da taxa respiratória e diminuição do volume tidal, imediatamente após a introdução de acetato de etilo na câmara que continha os animais.

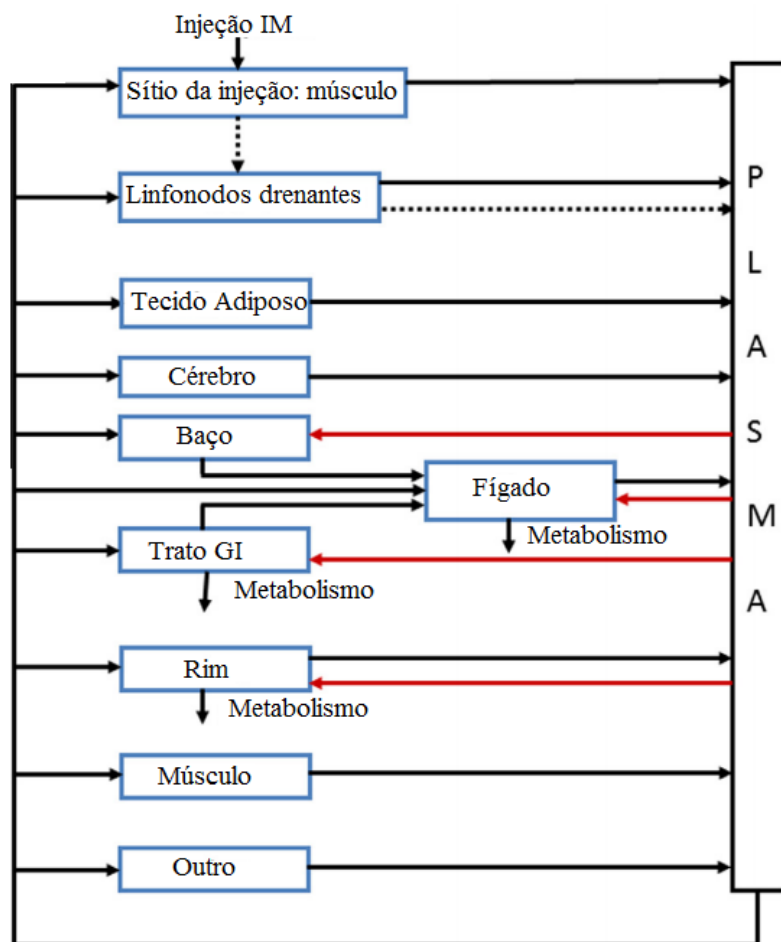
O modelo apenas permitiu a extrapolação da previsão de etanol no sangue após a exposição por via inalatória do mesmo, uma vez que, atualmente, ainda não se encontram disponíveis dados fisiológicos e bioquímicos para o acetato de etilo em humanos. (Crowell *et al.*, 2015).

#### **IV.8. Tegenge e Mitkus, 2015**

A vacinação tem um papel preponderante na manutenção da saúde pública. O desenvolvimento de novas e melhores vacinas encontra-se em constante expansão, assim como o desenvolvimento dos seus adjuvantes, isto é, componentes de determinadas vacinas que modulam a qualidade da resposta imunitária. Os sais de alumínio são os adjuvantes mais antigos e mais utilizados, contudo nos últimos anos desenvolveu-se uma nova classe de adjuvantes de vacinas, os adjuvantes de emulsão contendo óleo de esqualeno em água (SQ/W). Uma dessas novas classes (AS03) contém outro composto além do esqualeno, o alfa-tocoferol. O alfa-tocoferol é uma das formas de ocorrência natural da vitamina E, sendo a mais comum e a mais ativa biologicamente. Além disso, é um importante antioxidante, responsável por proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica.

O mecanismo pelo qual as emulsões SQ/W potenciam a resposta imune não se encontra completamente esclarecido. Porém, a evidência experimental com um dos adjuvantes dessa classe (MF59) sugere recrutamento de células imunes, captação de antígenos e supra-regulação de várias citocinas e quimiocinas no local da administração intramuscular. Estudos experimentais em ratos e a utilização de um modelo PBPK provaram a ausência de um efeito de depósito local e a deterioração rápida da emulsão a

partir do local da injeção. O modelo PBPK desenvolvido para o efeito encontra-se na Figura 18. (Tegenge e Mitkus, 2015).



**Figura 18:** Modelo PBPK esquemático, realizado a alfa tocoferol após a injeção IM em vacinas contra a gripe.

O modelo PBPK construído neste estudo fornece uma visão quantitativa sobre o destino *in vivo* e a biodistribuição da nova geração de adjuvantes SQ/W, incorporados em vacinas para a gripe. Quanto mais modelos forem desenvolvidos, maior a possibilidade de, futuramente ser estudado um modelo aperfeiçoado, capaz de incorporar também relações de dose-resposta para diferentes faixas etárias. (Tegenge e Mitkus, 2015).

Atualmente já existem mais de 700 publicações sobre os modelos PBPK em químicos industriais, medicamentos, poluentes ambientais e misturas de químicos, simples ou complexas. (Yang *et al.*, 2004). Na Tabela 2 apresenta-se uma lista, que está longe de ser exaustiva, das moléculas cuja toxicinética foi estudada utilizando modelos PBPK.

**Tabela 2:** Algumas substâncias/fármacos cuja toxicocintética foi estudada recorrendo a modelos PBPK.

<b>Substância</b>	<b>Via de exposição</b>	<b>Estudo PBPK</b>	<b>Referências</b>
Acetato de Etilo	Via Inalatória	Modelos PBPK com 4 e 6 compartimentos	Crowell <i>et al.</i> , 2015.
Acetona	Inalação	Modelo PBPK com 8 compartimentos	Kumagai e Matsunaga, 1995.
Ácido Tricloroacético	Águas subterrâneas, ingestão.	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Abbas e Fisher, 1997.
Benzeno	Via Inalatória	Modelo PBPK com 6 compartimentos	Haddad <i>et al.</i> , 2001.
Clorofórmio	Pele e ar inspirado	Modelo PBPK com 9 compartimentos	Corley <i>et al.</i> , 2000.
Deltametrina (DLM)	Via oral	Modelo PBPK com 7 compartimentos	Tornero-Velez <i>et al.</i> , 2010.
Diclorometano	Via inalatória contacto com a pele, olhos ou ingestão.	Modelo PBPK com 6 compartimentos	Andersen <i>et al.</i> , 1987.
Difluorometano	Via inalatória	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Price e Krishnan, 2011.
Estireno	Via inalação	Modelo PBPK com 5 compartimentos	Ramsey e Andersen, 1984.
Etanol	Via oral	Modelos PBPK com 4 e 6 compartimentos	Crowell <i>et al.</i> , 2015.
Etilbenzeno	Via inalatória	Modelo PBPK com 5 compartimentos	Haddad <i>et al.</i> , 2001.
Hexacloroetano	Via inalatória	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Price e Krishnan, 2011.
Ibuprofeno	Via oral	Modelo monocompartimental	Murry <i>et al.</i> , 1999.
Lindano	Via oral	Modelo PBPK com 5 compartimentos	MacLachlan, 2010.

**Tabela 2 (cont.):** Substâncias/fármacos cuja toxicocinética foi estudada recorrendo a modelos PBPK.

Metformina, dioxina, midazolam e emtricitabina	Via oral	Modelo PBPK com 15 compartimentos	Xia <i>et al.</i> , 2013.
Metanol	Via inalatória	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Fisher <i>et al.</i> , 2000.
Metoprolol	Via Oral	Modelo PBPK bicompartmental	Komura, Kawase e Iwaki, 2005.
M-xileno	Via inalatória	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Price e Krishnan, 2011.
Omeprazol	Via oral	Modelo PBPK bicompartmental	Litalien <i>et al.</i> , 2005.
Pantoprazol	Via oral	Modelo monocompartmental	Litalien <i>et al.</i> , 2005.
PCB 153	Via oral	Modelo PBPK com 5 compartimentos	Weijs <i>et al.</i> , 2010.
Propranolol	Via Oral	Modelo PBPK bicompartmental	Komura, Kawase e Iwaki, 2005.
Sertralina	Via oral	Modelo PBPK monocompartmental	Johnson <i>et al.</i> , 2005.
TCE	Via oral ou inalatória	Modelo PBPK com 5 compartimentos	Fisher, 2000.
Tetracloroetileno	Via inalatória	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Price e Krishnan, 2011.
Timolol	Via oral	Modelo PBPK bicompartmental	Komura, Kawase e Iwaki, 2005.
Tolueno	Via inalatória	Modelo PBPK com 6 compartimentos	Haddad <i>et al.</i> , 2001.
Tramadol	Via oral	Modelo monocompartmental	Kotb <i>et al.</i> , 2007.
Tricloroetileno	Via inalatória	Modelo PBPK com 4 compartimentos	Price e Krishnan, 2011.

## V. Limitações da modelação PBPK

Apesar da intensa investigação e constante aperfeiçoamento, os modelos PBPK ainda apresentam algumas limitações na medida em que assentam numa descrição aproximada do organismo humano, que é visto como um conjunto de compartimentos interligados, num intensa simplificação dos tecidos, e requerem dados, acerca dos processos fisiológicos, bioquímicos e físico-químicos complexos que variam entre diferentes grupos etários ou sob certas condições fisiológicas e patológicas. (Gueorguieva, *et al.* 2006). Este tipo de informação não se encontra disponível numa única fonte, o que pode levar a dúvidas e à dificuldade em estabelecer uma fonte confiante de informação exata e consistente. Estes modelos refletem conhecimento científico atual, e enquanto alguns processos são conhecidos por serem bem caracterizados, outros são parcialmente ou pobremente caracterizados, tendo em conta as falhas de informação que existem. (Khalil e Läer, 2011).

É importante também ter em consideração que a validade e a qualidade das simulações dependem do modelo em causa e do modo como a informação é nele incorporada, bem como do propósito da simulação. Deste modo, a incerteza associada à informação utilizada deve ser corretamente considerada. Como as simulações estão associadas a erros de previsão e incerteza requerem uma avaliação exata e uma interpretação dos seus efeitos de modo a enquadrá-los no contexto certo. (Khalil e Läer, 2011).

Adicionalmente, uma das maiores limitações dos modelos PBPK reside no facto de se encontrarem fortemente dependentes dos estudos em animais. A discrepância observada no rato entre a  $CL_{int}$  obtida *in vitro* e a obtida *in vivo* constitui um grande obstáculo que, atualmente, dificulta a total implementação dos modelos PBPK em estudos em animais com vista à descoberta de novas substâncias. No entanto, têm vindo a ser desenvolvidos fatores de escala empíricos com o objetivo de colmatar esta situação.

A descoberta de uma explicação para a previsão da  $CL_{int}$  no rato a partir de estudos *in vitro*, constitui o objetivo ambicioso que falta para que os modelos farmacocinéticos de base fisiológica possam ser utilizados livremente para priorizar compostos, pela primeira vez, em estudo em animais. (Jones, Gardner e Watson, 2009).

## VI. Conclusão

Os estudos toxicológicos são atualmente rotineiros, quer no processo que conduz ao desenvolvimento de novos fármacos, quer no estudo de poluentes ambientais ou de qualquer outra substância que produza um efeito tóxico em animais ou que possa representar um risco para a saúde pública. Estes estudos eram até aos anos 80 do século passado feitos essencialmente através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Fruto do avanço científico nas áreas da fisiologia, bioquímica e informática foi por essa altura que foi possível obter uma descrição matemática realista da ADMET de uma substância introduzida num organismo e simulá-la com recurso a um programa informático num computador. Esta abordagem que passou a designar-se modelação PBPK descreve o organismo como uma série de compartimentos, correspondentes a órgãos e tecidos específicos, como o coração, fígado, cérebro, ossos, músculos, pulmões e outros. Entre cada compartimento, o transporte das substâncias é feito através dos fluidos fisiológicos, como sangue ou a bÍlis, ou através da difusão. A descrição matemática de um modelo PBPK consiste num sistemas de equações diferenciais não lineares que só é passível de resolução aproximada usando os tais métodos informáticos referidos anteriormente.

Nos últimos anos os modelos PBPK têm vindo a ser aperfeiçoados e os progressos têm sido notáveis, nomeadamente no que toca a prever a absorção e a distribuição dos compostos químicos num organismo animal e, posteriormente, os dados são tratados e é possível estimar esses parâmetros para o organismo humano.

Entre outros resultados estes modelos permitem prever a disposição das moléculas no organismo, obter os valores de concentração máxima ( $C_{máx}$ ), o tempo máximo de concentração ( $T_{máx}$ ) e a área sob a curva da concentração no plasma (AUC) e, em 46% dos casos obter ainda a disposição intravenosa, a solubilidade *in vitro* e estimar permeabilidades. O sucesso na obtenção destes parâmetros tem permitido reduzir o número de animais utilizados nos ensaios, bem como os custos associados aos estudos farmacocinéticos e toxicocinéticos de rotina. Por outro lado, também aumentam a velocidade com que se realiza a seleção dos compostos candidatos a fármacos, recorrendo às suas propriedades físico-químicas e aos dados obtidos nos estudos *in vitro*.

Diversos estudos demonstraram ser possível, através das equações utilizadas no PBPK prever o  $V_{ss}$  do rato com um erro aceitável para mais de 60% dos candidatos a novos medicamentos. A determinação do valor de  $V_{ss}$  através da utilização das equações torna possível a definição do valor de  $K_p$ , que pode ser utilizado nos modelos PBPK, o que permite uma melhor previsão dos perfis de concentração no plasma, em termos de forma, quando os perfis de concentração – tempo são multi-exponenciais.

Dada a natureza mecanicista dos Modelos PBPK, é ainda possível incorporar características fisiológicas e mecanicistas para prever a farmacocinética e a dose em determinados estados de doenças específicas e grupos de pessoas. Incorporando mudanças conhecidas no fluxo sanguíneo hepático, no citocromo P450, no volume do fígado, na função renal ou hepática em função da doença ou da idade, foi possível prever a farmacocinética humana para alguns compostos.

O sucesso e a aceitação pela comunidade científica e pela indústria da modelação PBPK como ferramenta essencial na investigação toxicológica é bem demonstrado pelo número de estudos publicados sobre esta temática até 2004, mais de 700 correspondendo a centenas de compostos.

## VII. Referências Bibliográficas

- Abbas, R. E Fisher, J. (1997). A physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene and its metabolites, chloral hydrate, trichloroacetate, dichloroacetate, trichloroethanol, and trichloroethanol glucuronide in B6C3F1 mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 147(1), pp. 15-30.
- Andersen, M. *et al.* (1987). Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 87, pp. 185–205.
- Bauer, R. Guzy, S. Ng, S. (2007). A survey of population analysis methods and software for complex pharmacokinetic and pharmacodynamics models with examples. *Journal of american association of pharmaceutical scientists*, 9(1), pp. E60-E83.
- Barreira, S. (2014). *Matemática aplicada às ciências farmacêuticas com Excel, Vol. 2*. Lisboa, Escolar Editora.
- Berrozpe, J. Lanao, J. Delfina, J. (2000). *Biofarmacia y farmacocinética – I*. Madrid, Editorial síntesis.
- Bischoff, K. Brown, R. (1966). Drug distribution in mammals. *Chem. Eng. Progr. Syrup. Ser.*, 62, pp. 32-45.
- Bois, F. Y. Jamei, M. e Clewell, H. J. (2010). PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals. *Toxicology*, 278(3), pp. 256-267.
- Csajka, C. e Verotta, D. (2006). Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling: history and perspectives. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 33(3), pp. 227-279.
- Corley, R. *et al.* (2000). Physiologically based pharmacokinetic modeling of the temperature-dependent dermal absorption of chloroform by humans following bath water exposures. *Toxicological Sciences*, 53(1), pp. 13-23.
- Crowell, S. *et al.* (2015). Physiologically based pharmacokinetic modeling of ethyl acetate and ethanol in rodents and humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), pp. 452-462.

- Dahl, S. *et al.* (2009). Incorporating physiological and biochemical mechanisms into pharmacokinetic-pharmacodynamic models: a conceptual framework. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 106, pp. 2-12.
- Dearden, J. (2003). In silico prediction of drug toxicity. *School of Pharmacy and Chemistry*, Liverpool John Moores University, 17, pp. 119-127.
- Dedrick, R. L. (1973). Animal scale-up. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 1(5), pp. 435-461.
- Ekins, S. *et al.* (2000). Progress in predicting human ADME parameters in silico. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), pp. 251-272.
- Ekins, S. Mestres, J. Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), pp. 9-20.
- Eisenbrand, G. Pool-Zobel, B. Baker, V. (2002). *Methods of in vitro toxicology*, 40(1), pp. 192-236.
- Fisher, J. W. (2000). Physiologically based pharmacokinetic models for trichloroethylene and its oxidative metabolites. *Environmental health perspectives*, 108 (2), pp. 265.
- Fisher, J. *et al.* (2000). Analysis of respiratory exchange of methanol in the lung of the monkey using a physiological model. *Toxicological Sciences*, 53(2), pp. 185-193.
- Gramatica, P. (2007). Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR and Combinatorial Science*, 26(5), 694.
- Gueorguieva *et al.* (2006). Optimal design for multivariate response pharmacokinetics models. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 33(2), pp. 97-124.
- Gueorguieva, I., Nesterov, I., Rowland, M. (2005). Reducing whole body physiologically based pharmacokinetic models using global sensitivity analysis: diazepam case of study. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 33(1), pp. 1-27.
- Golan, D. Tashjian, A. e Armstrong, E. (2011). *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. Lippincott Williams & Wilkins.

- Haddad, S. *et al.* (2001). A PBPK modeling-based approach to account for interactions in the health risk assessment of chemical mixtures. *Toxicological Sciences*, 63(1), pp. 125-131.
- Hayes, A. (2001). *Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia, Taylor & Francis Editor.
- Kaplan, S. *et al.* (1973). Pharmacokinetic profile of diazepam in man following single intravenous and oral and chronic oral administrations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 62(11), pp. 1789-1796.
- Komura, H. Kawase, A. e Iwaki, M. (2005). Application of substrate depletion assay for early prediction of nonlinear pharmacokinetics in drug discovery: assessment of nonlinearity of metoprolol, timolol, and propranolol. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94(12), pp. 2656-2666.
- Kotb, H. *et al.* (2007). Pharmacokinetics of oral tramadol in patients with liver cancer. *Journal of opioid management*, 4(2), pp. 99-104.
- Kumagai, S. e Matsunaga, I. (1995). Physiologically based pharmacokinetic model for acetone. *Occupational and environmental medicine*, 52(5), pp. 344-352.
- Krishnan, K. e Andersen, M. E. (1994). Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. *Principles and methods of toxicology*, 4, pp. 193-241.
- Litalien, C. *et al.* (2005). Pharmacokinetics of proton pump inhibitors in children. *Clinical pharmacokinetics*, 44(5), pp. 441-466.
- Johnson, D. *et al.* (2005). Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42(3), pp. 313-323.
- Jones, H. Gardner, I. Watson, K. (2009). Modelling and PBPK simulation in drug discovery. *The AAPS Journal*, 11(1), pp. 155-166.
- Khalil, F. e Läer, S. (2011). Physiologically based pharmacokinetic modeling: methodology, applications, and limitations with a focus on its role in pediatric drug development. *BioMed Research International*, 2011.
- LeBlanc, P. *et al.* (1997). *Tratado de Biofarmácia e Farmacocinética*. Lisboa, Editorial Minerva.

- MacLachlan, D. J. (2010). Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry. *Food Additives and Contaminants*, 27(3), pp. 302-314.
- Murry, D. *et al.* (1999). Pharmacokinetics of ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 19(3), pp. 340-345.
- Nestorov, I. (2007). Whole-body physiologically based pharmacokinetic models.
- Poulin, P. e Theil, F. (2002). Prediction of pharmacokinetics prior to In Vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(5), pp.1358-1370.
- Price, K. e Krishnan, K. (2011). An integrated QSAR–PBPK modelling approach for predicting the inhalation toxicokinetics of mixtures of volatile organic chemicals in the rat. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 22(1-2), pp. 107-128.
- Ramsey, J. e Andersen, M. (1984). A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73(1), pp. 159-175.
- Roche – Farmacêutica química, Lda. (2015). *Os ensaios clínicos*. Amadora, Roche.
- Rowland, M. Balant, L. e Peck, C. (2004). Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29–30, 2002). *AAPS PharmSci*, 6(1), pp. 56-67.
- Stine, K. E. e Brown, T. M. (2015). *Principles of toxicology*. CRC Press.
- Tegenge, M. e Mitkus, R. (2015). A first-generation physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model of alpha-tocopherol in human influenza vaccine adjuvant. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(3), pp. 353-364.
- Thompson, M. Beard, D. Wu, F. (2012). Use of partition coefficients in flow-limited physiologically based pharmacokinetic modeling. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 39, pp. 313-327.
- Tornero-Velez, R. *et al.* (2010). Evaluation of deltamethrin kinetics and dosimetry in the maturing rat using a PBPK model. *Toxicology and applied pharmacology*, 244(2), pp. 208-217.

Weijs, L. *et al.* (2010). Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models for lifetime exposure to PCB 153 in male and female harbor porpoises (*Phocoena phocoena*): Model development and evaluation. *Environmental science & technology*, 44(18), pp. 7023-7030.

Williams, P. James, R. e Roberts, S. (2000). *Principles of toxicology*. Environmental and Industrial Applications.

Xia, B. *et al.* (2013). A Simplified PBPK Modeling Approach for Prediction of Pharmacokinetics of Four Primarily Renally Excreted and CYP3A Metabolized Compounds During Pregnancy. *The AAPS journal*, 15(4), pp. 1012-1024.

Yang, R. *et al.* (2004). Appendix A. A general reference on physiologically-based pharmacokinetic/pharmacodynamics (PBPK/PD) modeling. *Mouse models of cancer*, 23, pp.391-405