

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Modelagem PK/PD do efeito anticancerígeno do etoposídeo em ratos com  
tumor de Walker-256 utilizando concentrações livres intratumorais  
determinadas por microdiálise**

**MAIARA CÁSSIA PIGATTO**

Porto Alegre, 2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Modelagem PK/PD do efeito anticancerígeno do etoposídeo em ratos com  
tumor de Walker-256 utilizando concentrações livres intratumorais  
determinadas por microdiálise**

Tese apresentada por **Maiara Cássia  
Pigatto** para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa  
Coorientadora: Profa. Dra. Andréia Buffon

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 28.08.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bibiana Verlindo Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rafael Roesler  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Diniz  
Universidade Estadual de Maringá

Pigatto, Maiara Cássia  
Modelagem PK/PD do efeito anticancerígeno do etoposídeo em ratos com tumor de Walker-256 utilizando concentrações livres intratumorais determinadas por microdiálise / Maiara Cássia Pigatto. -- 2015.  
151 f.

Orientador: Teresa Dalla Costa.

Coorientador: Andréia Buffon.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. fármacos anticâncer. 2. etoposídeo. 3. penetração tumoral. 4. modelagem PK/PD. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II. Buffon, Andréia, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos e no Laboratórios 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento do CNPq. A autora realizou estágio sanduíche no *Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Università degli studi di Pavia* (Pavia, Itália) sob orientação do Prof. Dr. Paolo Magni. A autora recebeu bolsa de doutorado CAPES e bolsa PDSE/CAPES.



## **AGRADECIMENTOS**

À professora Teresa Dalla Costa pela orientação não somente deste trabalho, mas desde a iniciação científica, pelo incentivo e exemplo de profissionalismo. Muito obrigada!

À professora Andréia Buffon pela colaboração e discussões científicas.

À pesquisadora Sandra Coccuzzo Sampaio pela doação das células de tumor de Walker-256.

À professora Bibiana Araújo e colegas do grupo de Farmacocinética da UFRGS que fizeram parte desta caminhada, em especial Bruna, Cristiane, Ticiane, Francine, Estevan, Felipe, Fernanda, Fernando, João Victor, Priscila, Carolina, Izabel, Andressa, Jaqueline e Eduardo, pelas discussões científicas, ajuda nos experimentos e amizade.

Às alunas de iniciação científica Daniele e Renatha pelo auxílio nos experimentos.

Ao professor Paolo Magni (Università di Pavia - Itália), pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa e colaboração essencial para a condução deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do laboratório BMS (Università di Pavia - Itália) por me receberem de braços abertos, pelas discussões científicas e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários da UFRGS pela colaboração direta ou indireta.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelas bolsas de doutorado e auxílio financeiro.

Aos meus pais Félix e Nadir, pelo incentivo, amor e dedicação.

Ao meu amor Eidy, por ser meu maior incentivador e estar sempre ao meu lado, mesmo quando estivemos distantes fisicamente.

A todos os amigos que contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.



## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi descrever a relação entre as concentrações plasmáticas totais e livres tumorais do etoposídeo (ETO) e a inibição do crescimento do tumor observada em ratos Wistar portadores de tumor Walker-256 (W256) utilizando a modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD).

**Métodos:** Os procedimentos com animais foram aprovados no CEUA/UFRGS sob o número 22302. Os experimentos de farmacocinética foram realizados para determinar concentrações plasmáticas e livres em duas regiões do tumor sólido W256 através de microdialise. Após a administração do ETO nas doses de 10 ou 20 mg/kg i.v. *bolus* em ratos Wistar portadores de tumor W256, amostras de sangue e microdialisado de tecido do centro e periferia do tumor foram coletadas simultaneamente, até 7 h pós-dose, para determinar o fator de penetração no tumor. Um método analítico por CLAE-UV foi desenvolvido e validado para quantificação do etoposídeo nas amostras de plasma e dialisado. Os experimentos de farmacodinâmica foram conduzidos em ratos portadores de tumor W256 que receberam ETO 5 e 10 mg/kg i.v. *bolus* uma vez ao dia por 8 e 4 dias, respectivamente. O volume dos tumores foram monitorados diariamente durante 30 dias. Análise não-compartimental dos dados de PK foi realizada no WinNonlin<sup>®</sup>. A modelagem dos dados PK e PK/PD foi realizada no Monolix<sup>®</sup>, utilizando abordagem populacional. Os dados PK/PD foram analisados usando o modelo Simeoni TGI modificado através da introdução de uma função  $E_{max}$  para descrever a relação não-linear entre a concentração plasmática e tumoral e o efeito. **Resultados e Discussão:** O método por CLAE-UV foi desenvolvido e validado para quantificar as amostras de ETO em plasma e tecido. A penetração do ETO no tumor foi maior na periferia ( $61 \pm 15\%$  e  $61 \pm 29\%$ ) do que no centro do tumor ( $34 \pm 6\%$  e  $28 \pm 11\%$ ) após administração das doses 10 e 20 mg/kg, respectivamente (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ). Um modelo de 4 compartimentos compreendendo uma distribuição saturável (cinética de Michaelis-Menten) nos compartimentos tumorais a partir do compartimento central modelou simultaneamente os perfis de concentração-tempo do ETO em plasma e em ambas regiões do tumor. O modelo populacional PK/PD Simeoni TGI- $E_{max}$  foi capaz de descrever o efeito antitumoral dependente do regime de administração do ETO utilizando concentrações totais plasmáticas ou livres no tumor, resultando em um maior  $k_{2max}$  (potência máxima) para as concentrações

livres ( $25,8 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  - intratumoral vs.  $12,6 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  - plasma total).

**Conclusões:** Os resultados mostram que a utilização das concentrações livres do fármaco no tumor para a modelagem PK/PD pode fornecer um melhor entendimento da relação farmacocinética e farmacodinâmica e melhoram a capacidade de previsão do modelo, considerando que a eficácia dos fármacos antineoplásicos no tratamento de tumores sólidos é dependente da capacidade do fármaco em se distribuir no tecido tumoral.

**Palavras-chave:** Fármacos anticâncer, etoposídeo, penetração tumoral, microdiálise, farmacocinética, modelo de inibição do crescimento tumoral, modelagem farmacocinética/farmacodinâmica.

## ABSTRACT

### Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of etoposide anticancer effect in Walker-256 tumor-bearing rats using free intratumoral concentrations determined by microdialysis

**Objective:** The aim of this study was to describe the relationship between total plasma and free interstitial tumor etoposide (ETO) concentrations and the drug tumor growth inhibition observed in a Walker-256 (W256) tumor-bearing Wistar rat model using the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modeling.

**Methods:** The experiments with animals were approved by CEUA/UFRGS (protocol number 22302). Pharmacokinetic experiments were conducted to determine total plasma and free intratumoral concentrations in two regions of W256 solid tumor by microdialysis. After administration of ETO 10 or 20 mg/kg i.v. *bolus* to W256 tumor-bearing Wistar rats, blood and tissue microdialysate samples from tumor center and periphery were simultaneously collected up to 7h to determine the tumor penetration factor. An analytical HPLC-UV method was developed and validated for quantification of ETO in plasma and microdialysate samples. The pharmacodynamic experiments were conducted in W256 tumor-bearing rats that received ETO 5 or 10 mg/kg i.v. *bolus* every day for 8 and 4 days, respectively. Tumor volumes were monitored daily for 30 days. Non-compartmental analysis of PK data was performed in WinNonlin<sup>®</sup>. The PK and PK/PD modeling by population approach were performed using Monolix<sup>®</sup>. PK/PD data were analyzed using a modification of Simeoni TGI model by introducing an  $E_{max}$  function to describe the nonlinear relationship between tumor and plasma concentrations and effect. **Results and Discussion:** The HPLC-UV method was developed and validated to determine plasma and tissue samples of ETO. ETO tumor penetration was higher in the tumor periphery ( $61 \pm 15\%$  and  $61 \pm 29\%$ ) than center ( $34 \pm 6\%$  and  $28 \pm 11\%$ ) following 10 and 20 mg/kg doses, respectively (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ). A 4-compartment structural model comprising a saturable distribution (Michaelis-Menten kinetics) into the tumor compartments from the central compartment simultaneously described the ETO concentration–time profiles in plasma and both tumor regions. The PK/PD population Simeoni TGI– $E_{max}$  model was capable of describing the schedule-dependent antitumor effects of ETO using total plasma or free tumor concentrations obtained in a W256-tumor bearing

Wistar rat model, resulting in higher  $k_{2max}$  (maximal potency) for free concentrations (25.8 mL. $\mu\text{g}^{-1}$ .day<sup>-1</sup> - intratumoral vs. 12.6 mL. $\mu\text{g}^{-1}$ .day<sup>-1</sup> total plasma). **Conclusions:** The results showed that the use of free intratumoral drug concentrations in the PK/PD modeling can provide a better understanding of the pharmacokinetics and pharmacodynamics relationship and improve the forecasting ability of the models considering that the efficacy of antineoplastic drugs in the treatment of solid tumors is dependent on the drug ability to distribute into the tumor.

**Keywords:** Anticancer agents, etoposide, tumor penetration, microdialysis, pharmacokinetics, tumor growth inhibition model, pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Modelo PK/PD de morte celular ciclo-celular não específico.....	33
Figura 2. Modelo PK/PD de morte celular ciclo-específico.....	34
Figura 3. Modelo PK/PD de compartimento de trânsito.....	35
Figura 4. Modelo PK/PD de compartimento de trânsito duplo.....	36
Figura 5. Modelo PK/PD de inibição do crescimento tumoral – TGI.....	38
Figura 6. Estrutura do modelo PK/PD de compartimento de trânsito descrevendo a mielossupressão induzida pela quimioterapia.....	39
Figura 7. Estrutura química do etoposídeo.....	43

### CAPÍTULO 1

Figure 1. Chromatograms of blank rat plasma, blank plasma spiked with etoposide (3500 ng/mL) and phenytoin (IS) (1 µg/mL), and a plasma sample (869 ng/mL) collected 2 h after an i.v. administration of etoposide (15 mg/kg)....	57
Figure 2. Chromatograms of microdialysate blank sample, medium QC sample (625 ng/mL) and tumor microdialysate sample (99.81 ng/mL) 3 h after an i.v. administration of etoposide (15 mg/kg).....	57
Figure 3. Mean concentration–time profiles of etoposide after i.v. <i>bolus</i> dose of 15 mg/kg to Walker-256 tumor-bearing Wistar rats.....	63

### CAPÍTULO 2

Figure 1. Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained sections of W256 Wistar rat tumor showing the tumoral periphery and center without probe insertion; periphery and center longitudinally sliced through the microdialysis probe membrane location; and periphery and center transversally sliced through the microdialysis probe membrane location.....	83
Figure 2. Mean total plasma and free tissue profiles from tumor peripheral and central region after ETO i.v. <i>bolus</i> dosing of 10 and 20 mg/kg to Wistar W256 tumor-bearing rats (Mean ± SD, n = 10 and 14 for lower and higher dose, respectively).....	84
Figure 3. Structure of the final popPK model.....	87

Figure 4. Individual and population fitted plasma and tumor profiles using nonlinear mixed-effect modeling approach.....	90
Figure 5. Goodness-of-fit plots for the final popPK model.....	92
Figure 6. Visual predictive check (VPC) plot of the final popPK model based on 1,000 simulated replicates of the original data.....	93

### CAPÍTULO 3

Figura 1. PopPK model structure.....	108
Figura 2. Scheme and differential equations of the Simeoni TGI model.....	111
Figura 3. Plots with average observed, left censored data and model-fitted tumor growth curves in rats given either the vehicle (control) or etoposide i.v. (10 mg/kg for 4 days or 5 mg/kg for 8 days). Model predictions using the Simeoni TGI model considering total plasma and free tumor concentration.....	114
Figura 4. Plots with average observed, left censored data and model-fitted tumor growth curves in rats given either the vehicle (control) or etoposide i.v. (10 mg/kg for 4 days or 5 mg/kg for 8 days). Model predictions using the Simeoni TGI- $E_{max}$ model considering total plasma or free tumor concentration..	115
Figura 5. Plots with observed, left censored data, individual predicted and population predicted tumor growth curves obtained in rats given either the vehicle (control) or etoposide i.v. (10 mg/kg- 4 d or 5 mg/kg- 8 d).....	116
Figura 6. Goodness-of-fit plots for the tumor weight using total plasma or free tumor concentrations.....	119
Figura 7. VPC of the final PK/PD model stratified by group using total plasma and free tumor concentration based on 1000 simulated replicates of the original data.....	120

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1. Intra- and inter-day precision and accuracy of etoposide determination in rat plasma samples.....	59
Table 2. Intra- and inter-day precision and accuracy of the method for determination of etoposide in microdialysate samples.....	60
Table 3. Stability of etoposide in rat plasma samples.....	61
Table 4. Stability of etoposide in Ringer's solution.....	62

### CAPÍTULO 2

Table 1. ETO microdialysis probes <i>in vitro</i> recovery considering perfusion flow rate, drug concentration and recovery method.....	81
Table 2. ETO plasma pharmacokinetic parameters determined by NCA of individual profiles.....	84
Table 3. ETO W256 tumoral pharmacokinetic parameters determined by NCA of individual profiles.....	85
Table 4. Parameter estimates of the final ETO popPK model.....	91

### CAPÍTULO 3

Table 1. Parameter estimates of the final PK/PD model.....	118
--	-----



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	21
REVISÃO DE LITERATURA.....	25
1. Câncer.....	27
2. Modelagem PK/PD de antitumorais.....	29
2.1 Modelo <i>in vivo</i> para avaliação PK/PD .....	30
2.2 Equações dos modelos matemáticos de PK/PD .....	32
3. Microdiálise.....	40
4. Etoposídeo.....	42
CAPÍTULO 1 - HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: Application to pharmacokinetic studies..	45
CAPÍTULO 2 - Population pharmacokinetic modeling of etoposide concentrations in plasma and tumor tissue in rats.....	69
CAPÍTULO 3 - Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of etoposide tumor growth inhibitory effect in Walker-256 tumor-bearing rat model using free intratumoral drug concentrations.....	101
DISCUSSÃO GERAL .....	127
CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS GERAIS.....	139
ANEXO – Parecer do Comitê de Ética.....	151







O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células que invadem órgãos e tecidos, sendo considerado um sério problema de saúde pública mundial (RODRIGUES, 2011).

Atualmente, o recurso mais empregado no tratamento do câncer é a quimioterapia, a qual utiliza medicamentos antitumorais que agem inibindo o crescimento celular, atuando sobre o controle da divisão e do desenvolvimento celular. O efeito antitumoral dos fármacos é dependente da ação citotóxica, afetando indistintamente células normais e alteradas, o que leva ao surgimento de inúmeros efeitos adversos relacionados à terapia (ALMEIDA et al., 2005). Além disso, outro desafio da quimioterapia é a resistência adquirida, onde as células respondem/desenvolvem/melhoram características específicas para superar a toxicidade do agente após o primeiro ciclo de tratamento, ou a resistência intrínseca, onde as células já possuem mecanismos que tornam o fármaco ineficaz. Superar a resistência é um dos maiores desafios do tratamento quimioterápico do câncer (HUBER et al., 2010; ROCHE, 2011). Nesse contexto, ainda permanecem em aberto questões importantes como a determinação de protocolos ótimos para o tratamento quimioterápico e a busca por agentes quimioterápicos mais específicos, eficazes e seguros, pois apesar dos avanços na síntese orgânica, um número limitado de fármacos para o tratamento de câncer está disponível no mercado (SONDHI et al., 2010; GUPTA et al., 2013; WALGREN & SLAPAK, 2014).

Frente às implicações do tratamento oncológico, a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) pode ser extremamente útil na seleção de novas entidades químicas (NEQ) em desenvolvimento e na escolha da melhor dose e posologia para novos fármacos, considerando que os antitumorais geralmente têm uma janela terapêutica estreita (VAN KESTEREN et al., 2003; FRIBERG, 2003; SUNG et al., 2009).

Na oncologia, os modelos PK/PD têm sido desenvolvidos utilizando diferentes efeitos farmacodinâmicos como o crescimento do tumor, biomarcadores de resposta, bem como os efeitos adversos do fármaco em estudos realizados em modelos animais ou em humanos (BENDER et al., 2015). A maioria desses modelos PK/PD utiliza as concentrações plasmáticas totais do antitumoral como *input* farmacocinético, assumindo que essas são representativas das concentrações alcançadas no tumor. No entanto, no caso de tumores sólidos, a vascularização e o ambiente intratumoral são bastante heterogêneos e distintos dos tecidos normais

podendo gerar concentrações teciduais diferentes das plasmáticas e, conseqüentemente, a relação dessas com o efeito pode não ser a mesma (WEI et al., 2009; NERINI et al., 2014). Nesse sentido, a utilização de concentrações livres intratumorais pode ser mais preditiva do efeito antitumoral do que as concentrações plasmáticas totais, possibilitando a construção de um modelo PK/PD mais fidedigno e capaz de prever, de forma mais adequada, a posologia para o tratamento oncológico.

Com base no exposto, o presente estudo pretende investigar a farmacocinética plasmática e a penetração tumoral, bem como o efeito do antitumoral etoposídeo, fármaco modelo, utilizando o modelo de tumor de Walker-256 (W256) em ratos Wistar e diferentes posologias do fármaco. A partir desses dados, desenvolver modelo PK/PD para descrever e comparar as diferentes posologias utilizando concentrações plasmáticas totais ou concentrações livres intratumorais do fármaco. A proposta é inédita na literatura e representa uma contribuição para o entendimento da importância das concentrações livres intratumorais nos modelos PK/PD tanto no processo de descoberta e avaliação de novas moléculas antitumorais bem como para a melhoria do tratamento do câncer utilizando quimioterapia.

**OBJETIVOS**

---



O objetivo geral deste trabalho é desenvolver modelo PK/PD para o antitumoral etoposídeo através do estabelecimento da relação matemática entre a inibição do crescimento tumoral *in vivo* e as concentrações plasmáticas totais ou livres tumorais do fármaco em modelo de tumor de W256 em ratos Wistar.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Desenvolver e validar método analítico por CLAE-UV para quantificação do etoposídeo em plasma e microdialisado de tecido tumoral;
- Estabelecer as condições experimentais e a recuperação das sondas de microdiálise para o etoposídeo *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar a farmacocinética plasmática e tecidual do etoposídeo em modelo de tumor sólido W256 em ratos Wistar através da técnica de microdiálise;
- Desenvolver modelo farmacocinético populacional para descrever os perfis de concentração por tempo do etoposídeo em plasma e fluido intersticial tumoral;
- Investigar o efeito do etoposídeo sobre o crescimento tumoral em modelo de tumor de W256 em ratos Wistar após a utilização de diferentes posologias;
- Desenvolver modelo PK/PD para descrever o efeito temporal do etoposídeo *in vivo* utilizando diferentes posologias e tendo como *input* concentrações livres intratumorais e plasmáticas totais do fármaco.

A parte experimental e os resultados obtidos nesta tese estão apresentados a seguir organizados em três capítulos redigidos na forma de artigos científicos, apresentados após a revisão de literatura.







## 1. Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento anormal e desordenado de um determinado tecido, que passa a agir de forma autônoma e descontrolada, podendo acometer diversos órgãos do organismo (ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2014).

O surgimento do câncer ocorre através da transformação de uma célula normal em célula cancerosa devido a alterações genéticas, principalmente mutações em oncogenes e genes supressores de tumores. As características que diferenciam os tipos de câncer entre si variam de acordo com o tipo de célula acometida, pois cada célula possui mecanismos múltiplos e independentes que regulam o seu crescimento e diferenciação (WHITE et al., 2013).

A determinação das causas do câncer é um árduo esforço realizado pelos epidemiologistas, pois sua origem se dá por condições multifatoriais. Esses fatores causais podem agir em conjunto para iniciar ou promover o câncer (BRASIL, 2014). Tabagismo, alcoolismo, obesidade, exposição a carcinógenos ambientais e a agentes infecciosos são os principais fatores de risco de morte por câncer no mundo (VINEIS & WILD, 2014). Apesar de um grande número de estudos, a influência que cada um desses fatores exerce para o surgimento da doença é desconhecida e provavelmente varia para cada tipo de câncer (WHITE et al., 2013).

Em 1971 foi declarada a “guerra” contra o câncer, pois de cada grupo de 100 mil habitantes nos Estados Unidos, 163 morriam da doença (MELLO & MENCARINI, 2008). Após mais de 40 anos, apesar dos avanços médico-tecnológicos e do aumento global na expectativa de vida, a incidência de câncer aumenta a cada ano, assim como o número de mortes causadas por ele. De acordo com estimativas mundiais do projeto GLOBOCAN 2012, da Organização Mundial da Saúde (WHO), em 2012 o câncer matou 8,2 milhões de pessoas e houve 14,1 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo 7,4 milhões em homens e 6,7 milhões em mulheres. Em 2035, o número será de 24 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes pela doença em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (WHO, 2012). Uma estatística impressionante mostra que 40% de todos os americanos vivos hoje receberão o diagnóstico de câncer em algum momento de suas vidas (MELLO & MENCARINI, 2008).

No Brasil, é incontestável que o câncer é hoje um problema de saúde pública. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. O câncer de pele do tipo não-melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil) e mama feminina (57 mil) (BRASIL, 2014).

Três principais abordagens são empregadas no tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Abordagens ou combinações diferentes de tratamento são indicadas, dependendo do tipo de câncer, localização, grau de progressão e/ou nível de invasão e metástase (ROCHE, 2011).

Quando há ocorrência de metástase e visando também sua prevenção, além dos casos onde a cirurgia não é possível, faz-se necessário uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70 % dos casos, com a quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005). O principal objetivo da quimioterapia é destruir as células cancerosas mantendo as normais. Portanto, a quimioterapia desejável faz uso das mais altas doses toleráveis do fármaco para atingir o maior número de células cancerosas. Porém, a maioria dos agentes atua de forma inespecífica, atingindo além das células cancerosas também as células normais, o que resulta nos efeitos adversos comuns provocados pela quimioterapia (MENDONÇA, 2008).

Outro obstáculo para o sucesso da quimioterapia é a resistência aos fármacos que pode ser um fenômeno adquirido ou intrínseco. Resistência intrínseca significa que as células já possuem mecanismos que tornam o fármaco ineficaz, devido a fatores inerentes ao composto ou à célula tumoral em si, como baixa ativação metabólica no caso de um pró-fármaco; administração inadequada do fármaco ou falta de vascularização no microambiente do tumor (HUBER et al., 2010; ROCHE, 2011).

Já a resistência adquirida chamada de resistência a múltiplas drogas (MDR), ocorre após o primeiro ciclo de tratamento e é um dos maiores desafios na quimioterapia do câncer (LAGE, 2008). Os tumores normalmente consistem em populações mistas de células malignas, algumas das quais são sensíveis ao fármacos, enquanto outras são resistentes. A quimioterapia mata as células sensíveis, mas deixa para trás muitas células resistentes. Como o tumor começa a

crescer novamente, a quimioterapia pode falhar porque o tumor remanescente é de células resistentes (MERLIN et al., 2013).

Este fenômeno de resistência a múltiplas drogas está relacionado à presença de pelo menos duas “bombas” moleculares presentes na membrana das células tumorais chamadas de proteínas de transporte MRP1 e glicoproteína-P responsáveis pelo efluxo dos quimioterápicos para fora da célula. Estas bombas fazem com que as células tumorais impeçam a chegada do fármaco no citoplasma ou no núcleo, impedindo seus efeitos tóxicos e tornando-os ineficazes (NATURE, 2000; O’CONNOR, 2007; HUBER et al., 2010). Em virtude dessas limitações de tratamento, continua grande o interesse na pesquisa de novos fármacos mais específicos, eficazes, seguros e capazes de modular a resistência (MENDONÇA, 2008; HUBER et al., 2010).

Apesar dos esforços dispensados, o desenvolvimento de medicamentos em oncologia é um processo que requer, em média, 10 anos e investimentos da ordem de 1 bilhão de dólares para o fármaco ser aprovado para comercialização. Estima-se que apenas 10% das NEQ passam dos ensaios clínicos de Fase 1, sendo que na oncologia o sucesso é ainda menor (5%) (WALGREN & SLAPAK, 2014). Essa problemática é explicada pela falta de ensaios pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) que possam prever a eficácia e toxicidade dessas NEQ (KUMMAR, 2007; WONG et al., 2012). Além disso, mesmo após o desenvolvimento e aprovação dos fármacos, o regime terapêutico ideal permanece incerto, visto que eles proporcionam um aumento mínimo na sobrevida e estão associados a inúmeros efeitos adversos, indicando que os protocolos para o estabelecimento de doses empregados atualmente nem sempre são adequados (SUNG et al., 2009; GUPTA et al., 2013).

## **2. Modelagem PK/PD de antitumorais**

A modelagem PK/PD pode ser definida como a descrição matemática da relação entre a farmacocinética e a farmacodinâmica, a qual permite prever a variação do efeito com a variação da concentração do fármaco no organismo, em função do tempo (DERENDORF & MEIBOHM, 1999; GOBBURU, 2010).

Especialmente na oncologia, a modelagem PK/PD pode ser extremamente útil para o desenvolvimento racional de novos fármacos, na escolha da melhor dose e posologia, considerando que os antitumorais geralmente têm uma janela terapêutica estreita. A modelagem PK/PD também está sendo utilizada pela

indústria farmacêutica com o objetivo de minimizar a toxicidade dos fármacos nos paciente além de reduzir o número de ensaios clínicos necessários para liberar um novo fármaco no mercado (FRIBERG, 2003; BENDER et al., 2015). Além disso, novas recomendações das autoridades reguladoras da Europa e EUA reconhecem o valor das abordagens baseadas em modelos PK/PD nas avaliações pré-clínicas e clínicas durante o desenvolvimento de antitumorais (FDA, 2009; JONES & JONES, 2012; STAAB et al., 2013).

## **2.1 Modelos *in vivo* para avaliação PK/PD**

Os modelos PK/PD *in vivo* descrevem a relação da concentração do antineoplásico com o crescimento do tumor, com biomarcadores, bem como com os efeitos adversos a partir de dados obtidos de um tratamento em animais ou humanos (BENDER et al., 2015).

Os modelos animais são amplamente utilizados nos estudos PK/PD, pois permitem a investigação de uma extensa faixa de concentrações e posologias que não seriam possíveis nos estudos clínicos. A espécie preferida para o desenvolvimento do tumor e seu tratamento são os ratos, pois permitem repetidas coletas de sangue (FRIBERG, 2003), possuem a farmacocinética mais comparável aos humanos do que os camundongos (LI, 2009) e também são adequados para investigações dos efeitos hematológicos de novas entidades químicas ou fármacos antitumorais, uma vez que suas células sanguíneas são semelhantes às humanas (ULICH & DEL CASTILLO, 1991). Essa semelhança entre ratos e humanos permite previsões dos efeitos da mielossupressão de fármacos antineoplásicos em pacientes baseadas em dados de ratos, por exemplo (SCHURIG et al., 1986; FRIBERG et al., 2000a; FRIBERG et al., 2010). As diferenças significativas na forma como o câncer se desenvolve nos humanos e nos roedores não diminuem a importância dos modelos animais para a investigação de fármacos (ANISIMOV et al., 2005).

O desenvolvimento de modelos animais de tumores sólidos permite avaliar diretamente a capacidade do fármaco em inibir o crescimento do tumor através da comparação do tamanho do mesmo nos animais tratados e controle, permitindo assim descrever as curvas de crescimento tumoral, fazer previsões da cinética de crescimento em resposta aos diferentes tratamentos e avaliar a potência do fármaco (SIMEONI et al., 2004).

Empregando o modelo animal de tumores sólidos e avaliação do tamanho do tumor, SIMEONI e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo PK/PD denominado “Inibição do Crescimento Tumoral” (*Tumoral Growth Inhibition – TGI*), que mostrou-se capaz de descrever a redução do tamanho do tumor utilizando diferentes doses e posologias, independente do mecanismo de ação e indicação terapêutica dos fármacos (SIMEONI et al., 2004; MAGNI et al., 2006; TERRANOVA & MAGNI, 2012; YAMAZAKI et al., 2012). O modelo TGI também tem sido reconhecido como uma ferramenta útil para otimizar e selecionar candidatos a fármacos em diferentes fases do desenvolvimento. Além disso, foi demonstrada a capacidade de previsão do modelo TGI para o efeito de diferentes antineoplásicos de uso terapêutico em humanos utilizando parâmetros obtidos da modelagem de resultados de estudos em animais (ROCCHETTI et al., 2007). A previsão do efeito de candidatos a fármacos antitumorais em humanos baseados em estudos em animais proporciona uma base racional para o processo de desenvolvimento desses fármacos, permitindo que compostos inapropriados sejam descartados mais cedo no desenvolvimento, reduzindo o número de ensaios e consequentemente expondo menos pacientes a tratamentos não efetivos (ROCCHETTI et al., 2007; STEIMER, et al., 2010).

O modelo TGI também foi modificado para descrever o efeito após a coadministração de dois antineoplásicos. O uso da combinação de dois ou mais fármacos no tratamento tem sido uma estratégia amplamente adotada na clínica. A possibilidade de emprego do TGI para associações de antitumorais permite uma melhor caracterização da interação entre os efeitos e a seleção de combinações sinérgicas, que representam um desafio na terapia anticâncer (TERRANOVA et al., 2013).

Modelos que permitem a quantificação do crescimento/redução do tamanho do tumor têm se tornado mais populares também para descrever resultados clínicos. Wang e colaboradores (2009) desenvolveram um modelo capaz de prever a sobrevida global de pacientes com câncer de pulmão de pequenas células pela correlação desta com a redução no tamanho do tumor durante o tratamento. Claret e colaboradores (2009) também validaram um modelo capaz de prever a sobrevida de pacientes nos ensaios clínicos de Fase 3 a partir de dados da Fase 2. O modelo foi validado pela relação entre os dados de inibição do crescimento do tumor e sobrevida de pacientes com câncer colo-retal obtidos nos estudos de Fase 2 e 3 dos

antitumorais capecitabina e 5-fluoracil. Ambos modelos podem ser úteis na seleção de dose durante os estudos clínicos.

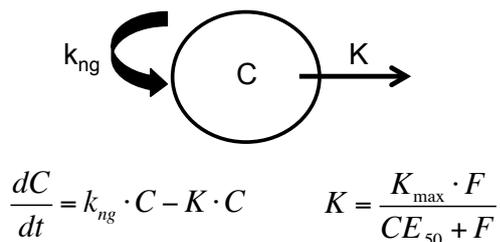
Apesar das aplicações citadas, muitas vezes existem grandes variações inter e intra-individuais em relação à sensibilidade do tumor ao antitumoral. Portanto, maior atenção tem sido dada a modelos que usam outros efeitos que não o tamanho do tumor para avaliar a eficácia do tratamento. Como exemplo pode-se citar contagem de leucócitos que caracterizam a mielossupressão induzida pelo tratamento quimioterápico, que tem sido usada para o desenvolvimento de modelos PK/PD (FRIBERG, 2003; ZANDVLIET et al., 2008; WALLIN et al., 2009). Modelo PK/PD utilizando esse efeito tem sido aplicado em diferentes situações como para descrever e prever a mielossupressão após o tratamento combinado de fármacos (SANDSTROM et al., 2006); para otimizar doses (FRIBERG et al., 2000b, ZANDVLIET et al., 2008); como uma ferramenta durante o desenvolvimento de fármacos (FRIBERG et al., 2002) e também para prever os efeitos mielotóxicos em humanos a partir de dados em ratos (FRIBERG et al., 2000a; FRIBERG et al., 2010). Usando a mielossupressão como efeito no modelo PK/PD podem-se fazer simulações visando determinar a posologia que maximiza a resposta antitumoral enquanto limita a toxicidade em um grau aceitável (STEIMER, et al., 2010).

Uma vez que muitos agentes antitumorais têm como mecanismo de ação a inibição de proteínas quinases em rotas de sinalização, a medida de fosfoproteínas que são produtos dessas rotas também se tornou um biomarcador importante para o desenvolvimento de modelos PK/PD *in vivo*. Fosfoproteínas tem sido utilizadas como biomarcadores para fármacos inibidores das proteínas quinases BCR/ABL presente na leucemia (LUO et al., 2006), cMet expressa em linhagens humanas de carcinoma gástrico (GTL16) e glioblastoma (U87MG) (YAMAZAKI et al., 2008), entre outros. Outros estudos mostram a relação entre a exposição e biomarcadores como pressão sanguínea e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), após o tratamento com fármacos anti-angiogênicos (ZHOU et al., 2007; LINDAUER et al., 2010; HANSSON et al., 2011), sendo esses efeitos considerados para o desenvolvimento de modelos PK/PD.

## **2.2 Equações dos modelos matemáticos de PK/PD**

Nos últimos 40 anos, diferentes modelos matemáticos têm sido construídos e aplicados para descrever a relação PK/PD de antitumorais (SIMEONI et al., 2013). O

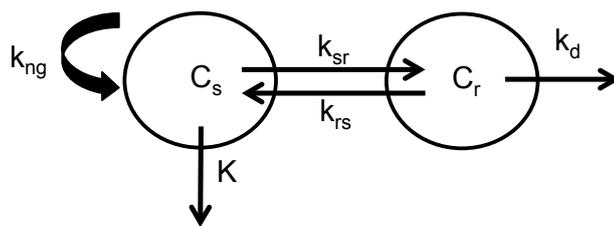
modelo matemático mais conhecido é o modelo  $E_{\max}$  que descreve o efeito do fármaco em relação à variação da concentração, prevendo o efeito máximo que um fármaco pode apresentar (DERENDORF & MEIBOHM, 1999). O modelo  $E_{\max}$  foi adaptado por Jusko (1971) para descrever o efeito dos antineoplásicos que possuem mecanismo de ação ciclo-celular não específico, conforme descrito na Figura 1.



**Figura 1.** Modelo PK/PD de morte celular ciclo-celular não específico onde  $C$  representa o número de células,  $k_{ng}$  é uma constante de primeira ordem de crescimento líquido (taxa de crescimento  $[k_g]$  menos a taxa de morte  $[k_d]$ ),  $K$  é o efeito do fármaco,  $F$  é a concentração do fármaco no meio,  $K_{\max}$  é o efeito máximo do fármaco e  $CE_{50}$  é a concentração do fármaco que produz 50% do efeito máximo (JUSKO, 1971).

A relação direta exposição-efeito obtida com o modelo  $E_{\max}$  tem sido amplamente utilizada para diferentes classes terapêuticas, no entanto, modelos que conseguem caracterizar a histerese entre concentração e efeito terapêutico podem fornecer informação adicional que permite o acerto mais adequado da posologia, além de auxiliar na escolha da dose ideal.

Nesse sentido, Jusko propôs um modelo de morte celular ciclo-específico para descrever a cinética do efeito quimioterápico quando o fármaco age em uma fase específica do ciclo celular (JUSKO, 1973). O modelo de morte celular ciclo-específico é apresentado na Figura 2.



$$\frac{dC_s}{dt} = k_g \cdot C_s - k_{sr} \cdot C_s + k_{rs} \cdot C_r - K \cdot C_s$$

$$\frac{dC_r}{dt} = k_{sr} \cdot C_s - k_{rs} \cdot C_r - k_d \cdot C_r \quad K = \frac{K_{\max} \cdot F}{CE_{50} + F}$$

**Figura 2.** Modelo PK/PD de morte celular ciclo-específico. Duas populações de células tumorais estão presentes: uma sensível ao fármaco, onde  $C_s$  se refere ao número de células sensíveis, e uma resistente, onde  $C_r$  se refere ao número de células resistentes. As constantes de primeira ordem  $k_{sr}$  e  $k_{rs}$  se referem às taxas de conversão das células entre as populações;  $k_g$  e  $k_d$  se referem às taxas de crescimento e morte celular, respectivamente.  $K_{\max}$  é o efeito máximo do fármaco (taxa máxima de morte das células sensíveis) (JUSKO, 1973).

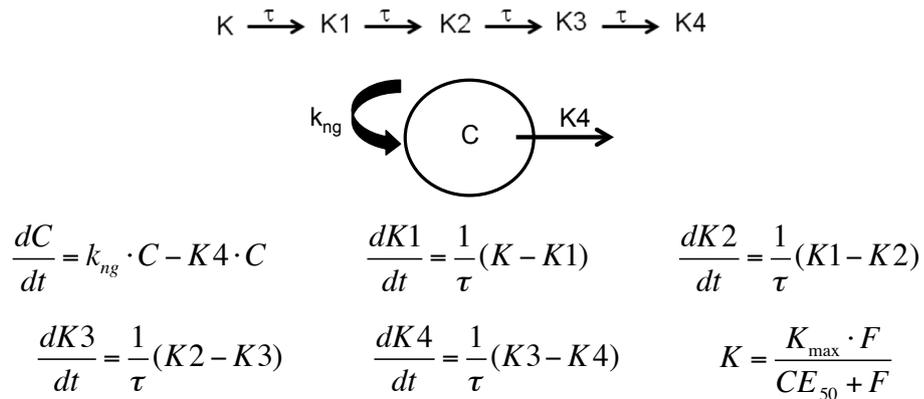
Utilizando esse modelo Jusko descreveu os efeitos da vincristina e vimblastina em linhagens de células de linfoma e hematopoiéticas de camundongo *in vitro* (JUSKO, 1973). Woo e colaboradores (1975) também mostraram que o efeito da carmustina, citarabina e metotrexato é ciclo-específico para a linhagem de células de leucemia também *in vitro*.

Apesar de algumas aplicações, o modelo ciclo-específico não é adequado para descrever os casos onde o efeito antitumoral é substancialmente atrasado em relação à exposição ao fármaco, ou seja, quando há histerese entre concentração do fármaco e efeito antitumoral. Como os efeitos quimioterápicos geralmente aparecem dias ou semanas após a exposição, esse modelo não tem mostrado êxito na otimização de posologias para a quimioterapia (LOBO & BALTHASAR, 2002; SUNG et al., 2009).

O modelo teórico de compartimento de trânsito, descrito por Sun & Jusko para descrever o efeito resultante de uma cascata de transdução de sinal (SUN & JUSKO, 1998) têm sido aplicado com sucesso para caracterizar o efeito antitumoral de fármacos que sofrem histerese, onde o descompasso entre concentração plasmática e o efeito é compensado através do uso de uma série de compartimentos de trânsito (LOBO & BALTHASAR, 2002; SUNG et al., 2009).

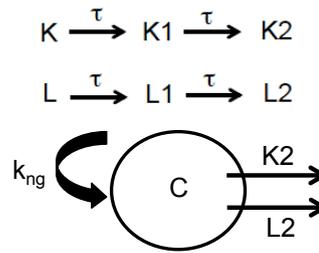
O modelo de compartimento de trânsito foi aplicado por Lobo & Balthazar (2002) para explicar o atraso na inibição do crescimento do tumor *in vitro* após

exposição ao fármaco metotrexato conforme apresentado na Figura 3.



**Figura 3.** Modelo PK/PD de compartimento de trânsito. K1-K4 são relacionadas a uma série de compartimentos de trânsito como função de morte celular, e  $\tau$  se refere ao tempo médio de trânsito em cada compartimento. Quatro compartimentos de trânsito são empregados neste exemplo, no entanto, apenas um parâmetro é usado para descrever a cinética de trânsito ( $\tau$ ). Como tal, o modelo é flexível, por causa do número de compartimentos de trânsito, e altamente estável, devido ao pequeno número de parâmetros ( $k_{ng}$ ,  $K_{max}$ ,  $CE_{50}$ ,  $\tau$ ) (LOBO & BALTHAZAR, 2002).

Uma modificação do modelo de compartimento de trânsito foi proposta por Sung e colaboradores (2009), onde dois grupos de compartimentos (modelo de compartimento de transito duplo K e L) foram empregados pelo fato de existirem dois mecanismos de ação do fármaco 5-fluoracil no tumor (inibição da síntese do RNA e DNA). No exemplo apresentado na Figura 4, dois compartimentos de trânsito são necessários para descrever o descompasso entre concentração do fármaco e efeito antitumoral.



$$\frac{dC}{dt} = k_{ng} \cdot C - K2 \cdot C - L2 \cdot C$$

$$\frac{dK1}{dt} = \frac{1}{\tau}(K - K1)$$

$$\frac{dL1}{dt} = \frac{1}{\tau_1}(L - L1)$$

$$\frac{dK2}{dt} = \frac{1}{\tau}(K1 - K2)$$

$$\frac{dL2}{dt} = \frac{1}{\tau_1}(L1 - L2)$$

$$K = \frac{K_{max} \cdot F}{CE_{50} + F}$$

$$L = \frac{L_{max1} \cdot F}{CE_{501} + F}$$

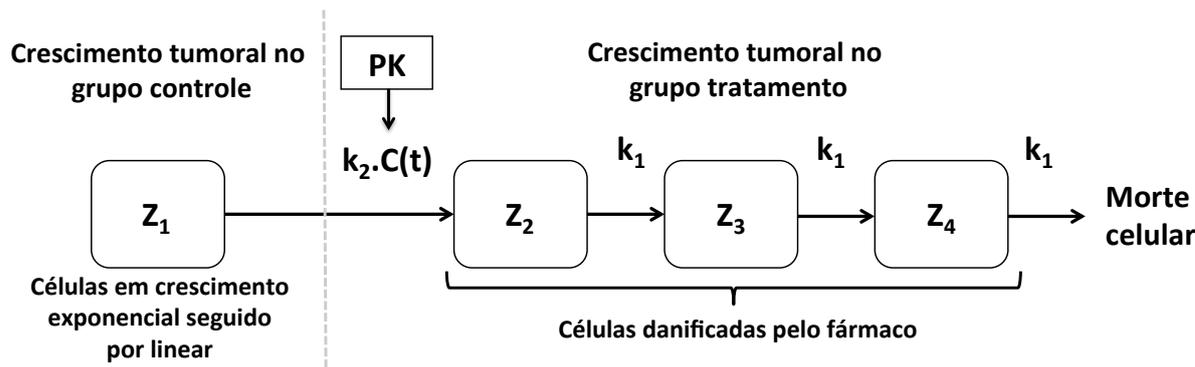
**Figura 4.** Modelo PK/PD de compartimento de trânsito duplo. Assume-se dois mecanismos de ação independentes e cada mecanismo é modelado por dois modelos de compartimento de trânsito separadamente (K e L), onde existem duas vias de morte celular.  $K_{max}$  e  $CE_{50}$  são diferentes de  $L_{max1}$  e  $CE_{501}$  e cada um, respectivamente, representa o efeito máximo e a concentração do fármaco que produz 50% do efeito máximo para o mecanismo de ação específico (SUNG et al., 2009).

Nos modelos descritos acima, a eficácia do antitumoral é obtida em termos de  $CE_{50}$  calculada através de diferentes curvas de crescimento do tumor obtidos após exposição a diferentes concentrações do fármaco em um tempo fixo. No entanto, a utilização destes dados é frequentemente limitada, pois a  $CE_{50}$  pode mudar significativamente quando calculada em diferentes tempos de exposição. Essa diferença não é observada nesses experimentos, pois utiliza-se apenas um tempo de exposição. Dessa forma, as condições experimentais podem fornecer conclusões inapropriadas sobre a eficácia de NEQ, levando à seleção inadequada do melhor composto para seguir nos estudos de desenvolvimento (DEL BENE et al., 2009).

Simeoni e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo similar ao modelo de compartimento de trânsito utilizado por Lobo & Balthazar (2002), no entanto matematicamente distinto, chamado de modelo de Simeoni ou TGI (citado em 2.1) apresentado na Figura 4. No estudo para o desenvolvimento desse modelo foram utilizados os fármacos 5-fluoracil, paclitaxel e mais três NEQ. O modelo descreve o grupo controle com um crescimento tumoral exponencial inicial seguido de um

crescimento linear. No grupo tratado o crescimento tumoral é alterado pela presença do antitumoral. As células que sofrem a ação do fármaco param de proliferar, passam por progressivos graus de dano, caracterizados por meio de compartimentos de trânsito, e então morrem. No modelo TGI descrito são utilizados três compartimentos para descrever três graus de dano às células que leva em conta o atraso no efeito em relação à exposição ao fármaco. Como pode ser observado na Figura 5, a ação do fármaco é determinada por dois parâmetros:  $k_1$ , que descreve a cinética da morte celular e  $k_2$ , fator de proporcionalidade que conecta a concentração plasmática ao efeito. Neste contexto,  $k_2$  é o parâmetro que descreve a potência do fármaco, ao invés da  $CE_{50}$ , proporcionando uma nova ferramenta para prever e/ou simular respostas a diferentes tratamentos.

A necessidade de introduzir um modelo de compartimento de trânsito adequado para descrever o efeito do antineoplásico sozinho ou em combinação, foi confirmada em trabalhos publicados pelo mesmo grupo de pesquisa (POGGESI et al., 2004; ROCCHETTI et al., 2005; MAGNI et al., 2006; ROCCHETTI et al., 2007; TERRANOVA & MAGNI et al., 2012; TERRANOVA et al., 2013) e por outros grupos (KOCH et al., 2009; GOTETI et al., 2010). Ainda, Bueno e colaboradores (2008) publicaram uma aplicação do modelo de Simeoni utilizando como parâmetro de efeito, além do tamanho do tumor, a porcentagem das proteínas Smad2,3 fosforiladas no tumor e no plasma para um candidato a fármaco inibidor de TGF-  $\beta$ .



### Equações do grupo controle

$$\frac{dw}{dt} = \lambda_0 \cdot w(t) \quad w(t) < w_{\text{threshold}}$$

$$\frac{dw}{dt} = \lambda_1 \quad w(t) \geq w_{\text{threshold}}$$

$$\frac{dw}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot w(t)}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot w(t)\right)^\psi\right]^{\frac{1}{\psi}}}; \quad w(0) = w_0$$

### Equações do grupo tratamento

$$\frac{dZ_1(t)}{dt} = \frac{\lambda_0 \cdot Z_1(t)}{\left[1 + \left(\frac{\lambda_0}{\lambda_1} \cdot w_1(t)\right)^\psi\right]^{\frac{1}{\psi}}} - k_2 \cdot C(t) \cdot Z_1(t)$$

$$\frac{dZ_2(t)}{dt} = k_2 \cdot C(t) \cdot Z_1(t) - k_1 \cdot Z_2(t)$$

$$\frac{dZ_3(t)}{dt} = k_1 \cdot Z_2(t) - k_1 \cdot Z_3(t) \quad Z_1(0) = w_0$$

$$\frac{dZ_4(t)}{dt} = k_1 \cdot Z_3(t) - k_1 \cdot Z_4(t) \quad Z_{2,3,4}(0) = 0$$

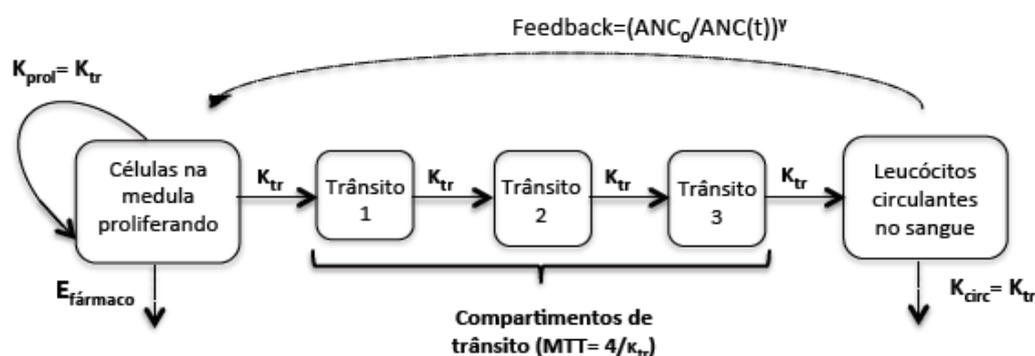
$$w(t) = Z_1(t) + Z_2(t) + Z_3(t) + Z_4(t)$$

**Figura 5.** Modelo PK/PD de inibição do crescimento tumoral - TGI (Adaptado de Simeoni et al., 2004). O grupo controle é definido por:  $w(t)$ : massa total de tumor;  $w_0$ : massa de tumor no momento da inoculação;  $\lambda_0$ : taxa de crescimento exponencial;  $\lambda_1$ : taxa de crescimento linear;  $w_{\text{threshold}}$ : massa de tumor quando o crescimento passa de exponencial para linear;  $\psi$ : fator para passar de exponencial para linear; e o grupo tratamento:  $Z_1(t)$ : massa de tumor em crescimento;  $Z_2(t)$ ,  $Z_3(t)$ ,  $Z_4(t)$ : massa de tumor em diferentes estágios de dano;  $k_2$ : potência do composto;  $k_1$ : taxa de transição entre os compartimentos de dano. Nesse modelo, os grupos controle e tratamento são modelados simultaneamente.

Modelos PK/PD que descrevem a toxicidade hematológica também têm sido utilizados para muitos antineoplásicos, pois o primeiro efeito observado após a administração desses fármacos é a leucopenia que é dose-limitante. A relação da exposição ao fármaco com a redução das células sanguíneas (leucócitos ou neutrófilos) tem sido feita utilizando o modelo de compartimento de trânsito proposto por Friberg e colaboradores (FRIBERG et al., 2000a; FRIBERG et al., 2000b; FRIBERG et al., 2002; HANSSON & FRIBERG, 2012). Compartimentos de trânsito também são atraentes para modelar a mielossupressão, pois eles mimetizam os diferentes estágios de maturação das células (FRIBERG, 2003) e o atraso para o efeito tóxico que pode ocorrer entre 4-5 dias após o início do tratamento (KARLSSON et al., 1995).

O modelo PK/PD para descrever a mielossupressão no exemplo descrito na

Figura 6 é composto por um compartimento representando as células que se multiplicam na medula óssea, três compartimentos de trânsito que mimetizam células que estão em maturação e um compartimento das células circulantes no sangue. Um mecanismo de *feedback* é também incorporado ao modelo representando o efeito endógeno de fatores de crescimento que aumentam a taxa de multiplicação da células quando o nível de leucócitos no sangue está baixo (FRIBERG, 2003).



**Figura 6.** Estrutura do modelo PK/PD de compartimento de trânsito descrevendo a mielossupressão induzida pela quimioterapia (Adaptado de Hansson & Friberg, 2012). Nesse modelo  $\text{ANC}_0$ : contagem de neutrófilos basal; MTT: tempo médio do processo de maturação celular que permitiu prever o atraso entre a administração e o efeito observado;  $K_{tr}$ : taxa de transição entre os compartimentos;  $K_{\text{circ}}$ : taxa de eliminação dos neutrófilos circulantes;  $E_{\text{fármaco}}$ : efeito do fármaco em função da concentração;  $(\text{ANC}_0 / \text{ANC}_t)^\gamma$ : feedback dos neutrófilos para regular a taxa de proliferação e  $\gamma$ : fator de feedback.

O modelo de compartimento de trânsito mostrado na Figura 5, com alterações no número de compartimentos dependendo do fármaco, foi aplicado com sucesso por Friberg e colaboradores que descreveram o efeito mielossupressor dependente do regime de dose de fármacos com diferentes mecanismos de ação como o 5-fluoracil em ratos (FRIBERG et al., 2000a), a 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine (DMDC) em pacientes com câncer de colo-retal ou de pulmão (FRIBERG et al., 2000b); docetaxel, paclitaxel, etoposídeo, DMDC, irinotecano e vinflunina com um número pequeno e esparsos de dados de pacientes com diferentes tipos de câncer (FRIBERG et al., 2002) e docetaxel em pacientes com câncer de mama (HANSSON & FRIBERG, 2012). O mesmo modelo foi adequado para caracterizar o perfil tanto de leucócitos como de neutrófilos e ainda o mecanismo de *feedback* observado após o tratamento com o antineoplásico, sendo útil não somente para explicar os

dados observados, mas também para prever e evitar a toxicidade nos ensaios clínicos de novos fármacos.

### **3. Microdiálise**

Os modelos PK/PD de antitumorais *in vivo* em geral trabalham com concentrações plasmáticas do antitumoral visando determinar a correlação dessas com o efeito. Apesar das concentrações plasmáticas serem importantes para tumores líquidos, a concentração e o acúmulo intratumoral desses fármacos são importantes no caso de tumores sólidos, uma vez que o microambiente dentro dos tumores é significativamente diferente do microambiente de tecidos saudáveis, principalmente em termos de vascularização, dificultando a penetração e a distribuição intratumoral de fármacos. Portanto, um melhor entendimento da penetração intratumoral do fármaco deve conduzir a um modelo PK/PD mais realista e com melhor capacidade de previsão do desfecho do tratamento oncológico (WEI et al., 2009).

Estudos de avaliação da concentração intratumoral do fármaco podem ser realizados através da análise de homogeneizados de tumor (AZRAK et al., 2005; AL-ABD, 2010; HOLDHOFF et al., 2010), no entanto as concentrações do fármaco determinadas com essa abordagem refletem apenas uma média da concentração local, pois são o resultado da concentração intra e extracelular adicionadas da concentração sanguínea residual. Nos últimos anos, técnicas não-invasivas como a tomografia por emissões de pósitrons (PET) e espectroscopia por ressonância magnética (MRS) têm possibilitado a avaliação continuada da exposição a agentes antitumorais. No entanto, essas alternativas não estão prontamente disponíveis e não podem oferecer a sensibilidade e especificidade desejada para a modelagem PK/PD (ZHOU & GALLO, 2005).

O desenvolvimento da microdiálise (MD) forneceu aos pesquisadores uma ferramenta específica para amostrar compostos endógenos e exógenos no espaço extracelular (ZHOU & GALLO, 2005). A MD permite determinar as concentrações livres do fármaco no líquido intersticial do tecido sob investigação, oportunizando um melhor entendimento sobre as relações exposição-resposta na pesquisa da relação PK/PD, auxiliando no desenvolvimento de fármacos mais eficazes (CHAURASIA et al., 2007; WEI et al., 2009).

A técnica de MD consiste basicamente na implantação de uma pequena sonda

no tecido a ser estudado, que é continuamente irrigada com líquido de perfusão compatível, mimetizando a função de um capilar sanguíneo. A porção terminal da sonda, que fica em contato direto com o órgão, possui uma membrana semipermeável que obedece aos princípios de difusão passiva e que é mantida em condição *sink*. O fluido de perfusão, uma solução aquosa isosmótica ao líquido intersticial (Ringer ou tampão fosfato), passa pela sonda a um fluxo baixo e constante (0,1- 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Apenas moléculas de baixo peso molecular, não ligadas a proteínas, presentes no fluido intersticial sofrem difusão passiva pela membrana e são recolhidas na outra extremidade da sonda. O líquido recolhido é chamado de dialisado e está pronto para ser analisado, sem necessidade de processamento da amostra (ZHOU & GALLO, 2005; CHAURASIA et al., 2007).

Como resultado da perfusão contínua da sonda, não ocorre equilíbrio entre a concentração do analito no tecido e no dialisado. Devido à condição *sink* estabelecida, a concentração do analito no dialisado representa uma fração da concentração livre presente no tecido. Portanto, para se determinar a real concentração livre tecidual do analito é necessário conhecer a taxa de recuperação das sondas. Os testes de recuperação são realizados *in vitro*, para se escolher as melhores condições experimentais, e *in vivo*, antes dos experimentos, para permitir o cálculo das concentrações livres teciduais reais do analito (PLOCK & KLOFT, 2005; CHAURASIA et al., 2007).

A técnica de MD tem sido empregada em estudos de farmacocinética de uma variedade de antineoplásicos utilizando diferentes modelos de tumor em animais (ratos e camundongos) e em pacientes com tumores acessíveis para a inserção da sonda. A distribuição da temozolomida utilizando a MD foi investigada na presença e ausência de um inibidor de angiogênese (TNP470) em modelo de glioma subcutâneo que superexpressa o VEGF. A presença do TNP470 levou a uma redução de 25 % na área sob a curva da temozolomida no tumor, pois acredita-se que a inibição da formação de vasos sanguíneos que provoca a morte celular também reduz a penetração do fármaco. Portanto, combinações usando inibidores angiogênicos e fármacos citotóxicos devem ser melhor investigadas a fim de poderem ser aplicadas efetivamente (DEVINENI et al., 1996).

BlochI-Daum e colaboradores (1996) foram os primeiros a avaliar a farmacocinética da carboplatina no fluido extracelular de melanoma em humanos usando a MD. Os resultados mostraram uma área sob a curva (ASC) no tumor de 50

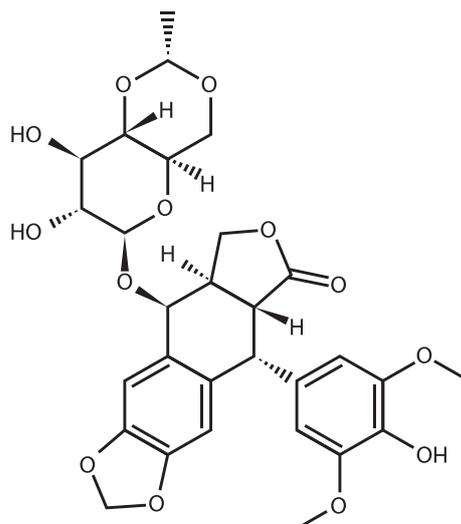
– 60 % do valor total plasmático, o que destaca a importância de monitorar as concentrações no tumor para se obter um tratamento mais efetivo.

Concentrações mais baixas no tumor em relação ao plasma também foram observadas para outros fármacos como a epirubicina em pacientes com câncer de mama, onde a ASC no tumor foi de 11 % da ASC do plasma (total) (HUNZ et al., 2007) e o metotrexato em modelo de tumor de mama em camundongos, onde a distribuição do fármaco foi avaliada em duas regiões do tumor (central e periférica) e resultou em uma penetração de 20% no centro e 30% na periferia que pode ser resultado da vascularização heterogênea no tecido tumoral (SANI, 2009). Considerando que a eficácia de um antitumoral depende da manutenção de concentrações adequadas no tumor, conclui-se que dados de penetração no tumor podem ser mais preditivos e melhor correlacionados com o efeito do que as concentrações plasmáticas.

Estudos de farmacocinética do etoposídeo utilizando MD já foram relatados na literatura para determinar concentrações plasmáticas, através da colocação da sonda na veia jugular de ratos (NAIK & WILLIAMS, 1996) e macacos (PASTAKIA et al., 2010). A MD também foi empregada para quantificar o etoposídeo em fígado de ratos, após administração local de uma matriz de colágeno contendo etoposídeo e ciclosporina A (inibidor da glicoproteína-P). A inclusão da ciclosporina A prolongou a concentração do etoposídeo no fígado (SATO et al., 1996). Outros estudos realizados por Burgio e colaboradores utilizaram a microdiálise cerebral para avaliar a influência da glicoproteína-P na farmacocinética do etoposídeo. Os estudos mostraram que as concentrações de etoposídeo em dialisado do cérebro e sangue aumentam quando o fármaco é administrado concomitantemente com a ciclosporina A (BURGIO et al., 1996; BURGIO et al., 1998).

#### **4. Etoposídeo**

O etoposídeo (Figura 7), um derivado semi-sintético da podofilotoxina, extraído da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum* ou *Podophyllum emodi*), foi sintetizado pela primeira vez em 1960 e introduzido em estudos clínicos no início dos anos 70. O fármaco é altamente solúvel em metanol e clorofórmio, ligeiramente solúvel em etanol e moderadamente solúvel em água. Portanto, formulações para administração intravenosa contêm solventes orgânicos como álcool benzílico, polietilenoglicol e etanol (ISSELL & CROOKE, 1979; SIRISANGTRAGUL, 2006).



**Figura 7.** Estrutura química do etoposídeo. A fórmula química do etoposídeo é  $C_{29}H_{32}O_{13}$  com um peso molecular de 588.56 g/mol.

O mecanismo de ação do etoposídeo é explicado pela inibição da topoisomerase II, induzindo a quebra do DNA (SLEVIN, 1991). É um fármaco altamente efetivo e amplamente usado como quimioterápico curativo e paliativo sozinho ou em associação para doenças malignas incluindo câncer de pulmão (pequenas células) (YOU, 2008), leucemia (ERIKCI et al., 2009), linfoma (TRANCHAND et al., 1999; MWANDA et al., 2009), sarcoma de Kaposi (TAS et al., 2013), sarcoma de Ewing, neuroblastoma, carcinoma do ovário e câncer testicular. Os efeitos adversos mais comuns incluem perda de cabelo, náusea, anorexia, diarreia e mielossupressão (SIRISANGTRAGUL, 2006).

A farmacocinética plasmática após dose intravenosa é descrita pelos modelos de dois (EVANS et al., 1982; ARBUCK et al., 1986) ou três compartimentos (HOLTHUIS et al., 1986), com uma meia vida de 6-9 horas em humanos (EVANS et al., 1982). Entre 33% e 66 % do fármaco é metabolizado (SLEVIN, 1991) e outros 26 a 53 % são excretados de forma inalterada na urina (HOLTHUIS et al., 1986). O fármaco é extensivamente ligado às proteínas plasmáticas, com uma alta variabilidade entre os pacientes, dependendo da concentração de albumina (JOEL et al., 1996).

O etoposídeo possui atividade dependente do tempo de exposição conforme demonstrada por SLEVIN e colaboradores (1989) que realizaram um estudo com 39 pacientes com câncer de pulmão tratados com etoposídeo na dose de 500 mg/m<sup>2</sup> em infusão intravenosa contínua durante 24 horas, ou em doses diárias de 100 mg/m<sup>2</sup> repetidas por cinco dias, sendo observada uma taxa de resposta de 10% e

89%, respectivamente. Portanto, os principais esquemas de administração intravenosa ou oral são baseados em doses variando de 50 a 200 mg/m<sup>2</sup>/dia de 1 a 5 dias, repetidas em intervalos de 3 a 4 semanas, objetivando uma maior eficácia antineoplásica (ISSELL & CROOKE, 1979; JOEL, 1996).

O etoposídeo foi o fármaco modelo escolhido para a execução deste trabalho, pois ainda não há estudos na literatura de penetração do mesmo em tumor sólido utilizando a técnica de microdiálise, assim como também não há modelos PK/PD desenvolvidos que relacionam a concentração livre do etoposídeo no tumor com o efeito.

**CAPÍTULO 1.** HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: Application to pharmacokinetic studies

---



## **HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: Application to pharmacokinetic studies**

Maiara Cássia Pigatto<sup>1,2</sup>, Daniele Lenz Mossmann<sup>2</sup> and Teresa Dalla Costa<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Centro Bioanalítico de Medicamentos, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

O capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 48 – 68.

Pigatto, MC; Mossmann, DL; Dalla Costa, T. HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: Application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 2015; 29(4): 529–536. doi: 10.1002/bmc.3308.

**CAPÍTULO 2.** Population Pharmacokinetic Modeling of Etoposide Concentrations in  
Plasma and Tumor Tissue in Rats

---



## **Population Pharmacokinetic Modeling of Etoposide Concentrations in Plasma and Tumor Tissue in Rats**

Maiara Cássia Pigatto<sup>1,2</sup>, Bibiana Verlindo de Araujo<sup>1</sup>, Bruna Gaelzer Silva Torres<sup>1</sup>,  
Stephan Schmidt<sup>3</sup>, Paolo Magni<sup>4</sup> and Teresa Dalla Costa<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil;

<sup>2</sup>CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília - DF, Brazil;

<sup>3</sup>Center for Pharmacometrics & Systems Pharmacology, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Orlando - FL, USA.

<sup>4</sup>Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, University of Pavia, Italy

O texto completo do capítulo 2, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 73 – 100, foi suprimido por tratar-se de manuscrito a ser submetido para publicação em periódico científico. O resumo do capítulo 2 está presente na página seguinte.

## ABSTRACT

**Purpose:** The goals of the study were to evaluate by microdialysis etoposide (ETO) free concentrations in two regions of Walker-256 solid tumor and to establish a population pharmacokinetic (popPK) model to describe simultaneously free tumor and total plasma concentrations.

**Methods:** Walker-256 tumor-bearing Wistar rats received ETO 10 mg/kg or 20 mg/kg i.v. *bolus*. Center and periphery tumor extracellular concentrations were collected up to 7 h using CMA/20 probes and blood samples via carotid artery cannulation. Plasma and tumor concentration-time profiles were analyzed by non-compartmental approach using WinNonlin<sup>®</sup> v. 5.3. PopPK modeling was conducted using MONOLIX v.4.3.3.

**Results:** ETO tumor penetration was higher in the periphery ( $61 \pm 15$  % and  $61 \pm 29$  %) than in tumor center ( $34 \pm 6$  % and  $28 \pm 11$  %) following 10 and 20 mg/kg doses, respectively (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ). A 4-compartment model fitted ETO concentration-time profiles in all sampling compartments. Body weight was an influential covariate on  $V_1$ .

**Conclusions:** The center and periphery of W256 tumor are differently exposed to ETO due to tumor heterogeneity. The developed popPK model allowed the fitting of plasma and tumor concentrations and a better understanding of ETO distribution in solid tumors.

**Keywords:** Etoposide, anticancer, microdialysis, drug tumor penetration, population pharmacokinetics.

**CAPÍTULO 3.** Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of etoposide tumor growth inhibitory effect in Walker-256 tumor-bearing rat model using free intratumoral drug concentrations

---



**Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of etoposide tumor growth inhibitory effect in Walker-256 tumor-bearing rat model using free intratumoral drug concentrations**

Maiara Cássia Pigatto (1, 2, 3) Renatha Menti Roman (3) Letizia Carrara (4) Andréia Buffon (1) Paolo Magni (4) and Teresa Dalla Costa\* (1, 3)

(1) Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

(2) CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília - DF, Brazil;

(3) Centro Bioanalítico de Medicamentos, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

(4) Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, University of Pavia, Italy

O texto completo do capítulo 3, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 105 – 126, foi suprimido por tratar-se de manuscrito a ser submetido para publicação em periódico científico. O resumo do capítulo 3 está presente na página seguinte.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to establish a population PK/PD model linking etoposide free tumor and total plasma concentrations to the inhibition of solid tumor growth in rats. Walker-256 tumor cells were inoculated subcutaneously in the right flank of Wistar rats, which were randomly divided in control and two treated groups that received etoposide 5 or 10 mg/kg i.v. *bolus* every day for 8 and 4 days, respectively, and tumor volume was monitored daily for 30 days. The plasma and intratumoral concentrations-time profiles were obtained from a previous study and were modeled by a four-compartment popPK model. PK/PD analysis was conducted using MONOLIX v.4.3.3 on average data and by mean of a nonlinear mixed-effect model. PK/PD data were analyzed using a modification of Simeoni TGI model by introduction of an  $E_{\max}$  function to take into account the concentration dependency of  $k_{2\text{variable}}$  parameter (variable potency). The Simeoni- $E_{\max}$  model was capable to fit schedule-dependent antitumor effects using the tumor growth curves from the control and two different administered schedules. The PK/PD model was capable of describing the tumor growth inhibition using total plasma or free tumor concentrations, resulting in higher  $k_{2\max}$  (maximal potency) for free concentrations (25.8 mL. $\mu\text{g}^{-1}.\text{day}^{-1}$  - intratumoral vs. 12.6 mL. $\mu\text{g}^{-1}.\text{day}^{-1}$  total plasma). These findings indicate that the plasma concentration may not be a good surrogate for pharmacologically active free tumor concentrations, empathizing the importance of knowing drug tumor penetration to choose the best antitumor therapy.

**Keywords:** etoposide, pharmacokinetics/pharmacodynamics, Walker-256 tumor, cancer chemotherapy, tissue penetration, mathematical model

**DISCUSSÃO GERAL**

---



Nos últimos anos, a indústria farmacêutica e as agências regulatórias como *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicine Agency* (EMA) têm aumentado o interesse pela modelagem PK/PD com o objetivo de aprovar medicamentos cada vez mais seguros, aprimorar o delineamento de estudos pré-clínicos e ensaios clínicos, além de verificar a validade dos dados já existentes na literatura.

Em oncologia, considerando que os antitumorais normalmente possuem uma janela terapêutica estreita, a modelagem PK/PD pode ser aplicada na seleção de posologias adequadas que aumentam a eficácia minimizando a toxicidade e no delineamento das fases pré-clínica e clínicas I, II e III de forma mais eficiente.

A maioria dos modelos PK/PD desenvolvidos para antitumorais utilizam as concentrações plasmáticas totais do fármaco para descrever o efeito. Nesses modelos assume-se que as concentrações plasmáticas são adequadas para descrever as concentrações alcançadas no tumor, que é o tecido alvo de ação do fármaco. No entanto, os tumores sólidos possuem um ambiente heterogêneo com vascularização anormal que limita a penetração dos fármacos e, conseqüentemente, as concentrações nesse tecido podem ser diferentes daquelas na circulação sanguínea. Desse modo, a utilização das concentrações livres intratumorais é crucial para prever o efeito de um fármaco antineoplásico no tratamento de tumores sólidos, apesar de os modelos PK/PD com essa abordagem serem ainda raros na literatura.

Atualmente a técnica mais recomendada para determinar as concentrações livres teciduais de fármacos é a microdiálise. Nesse contexto, um dos objetivos do trabalho foi investigar as concentrações intratumorais do etoposídeo em ratos portadores de tumor de W256 empregando a técnica de microdiálise. A microdiálise permite acessar as concentrações livres intersticiais do fármaco no tumor, permitindo um melhor entendimento de sua distribuição no tumor sólido. Estudos avaliando a concentração intratumoral do etoposídeo empregando a microdiálise ainda não foram descritos na literatura.

Para executar os experimentos de penetração tecidual do etoposídeo e avaliação de sua farmacocinética plasmática e tecidual, foi necessário desenvolver e validar metodologia analítica para a quantificação do fármaco em plasma e microdialisado tumoral. As amostras de microdialisado e plasma foram quantificadas utilizando o mesmo método bioanalítico por CLAE-UV, validado de acordo com

*guidelines* internacionais. Os resultados dessa etapa do trabalho fazem parte do artigo científico publicado no periódico *Biomedical Chromatography* (v. 29; p. 529–536; 2015. doi: 10.1002/bmc.3308) e foram apresentados no Capítulo 1.

Os estudos de farmacocinética plasmática e tecidual do etoposídeo em ratos Wistar portadores de tumor subcutâneo W256 foram realizados utilizando-se duas doses do fármaco, 10 e 20 mg/kg, administradas como dose única i.v. *bolus*. Previamente aos experimentos de microdiálise do etoposídeo no tumor foi necessário avaliar a recuperação das sondas CMA/20 em condições *in vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram que a recuperação relativa do etoposídeo não é concentração dependente e que é independente do método de recuperação utilizado (diálise ou retrodiálise), sendo apenas depende do fluxo de perfusão. A recuperação *in vivo* das sondas ( $24.66 \pm 3.64\%$ ) foi inferior à recuperação *in vitro* ( $40.37 \pm 2.4\%$ ) como já relatado previamente pelo grupo (HURTADO et al., 2014) e por outros autores para antitumorais diversos (EKSTROM et al., 1996; KONINGS et al., 2009).

Os resultados da avaliação farmacocinética não-compartimental dos perfis de concentração plasmática do etoposídeo mostraram que os parâmetros como *clearance*, volume de distribuição, tempo de residência média e meia-vida não apresentaram diferença significativa nas doses de 10 e 20 mg/kg ( $p > 0,05$ ) (Capítulo 2, Tabela 2), indicando que a farmacocinética plasmática do etoposídeo é linear na faixa de doses investigada.

A penetração do etoposídeo foi avaliada em duas regiões do tumor sólido de W256 - centro e periferia – visando investigar se a distribuição do fármaco diferia devido à heterogeneidade do tecido tumoral. A penetração do etoposídeo no tumor foi estatisticamente semelhante para as duas doses administradas, mas significativamente diferente entre as regiões do tumor avaliadas, resultando em penetração de  $61 \pm 15\%$  e  $61 \pm 29\%$  na periferia e  $34 \pm 6\%$  e  $28 \pm 11\%$  no centro do tumor, após as doses iv *bolus* de 10 e 20 mg/kg, respectivamente (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ). Embora a penetração não tenha sido diferente para as doses avaliadas, as ASCs do etoposídeo nas duas regiões do tumor não aumentaram proporcionalmente com o aumento da dose, indicando que a penetração intratumoral do fármaco não é linear. Essa saturação da penetração pode ser devida à alta densidade de células no tumor, funcionando como uma barreira para a penetração do fármaco (BRÚ et al., 2003; COLIN et al., 2014).

A menor penetração do etoposídeo no centro do tumor, com prolongamento da meia-vida de eliminação ( $8,84 \pm 1,64$  h and  $6,26 \pm 2,01$  h) em relação à periferia ( $2,30 \pm 0,88$  h and  $2,48 \pm 1,16$  h) para ambas as doses de 10 e 20 mg/kg, pode ser justificada pelas áreas de necrose observadas na análise histopatológica (Capítulo 2, Figura 1), que podem levar ao aumento de pressão intersticial impedindo a difusão do fármaco. A vascularização irregular e a heterogeneidade do tecido tumoral são fatores determinantes para a penetração irregular de fármacos antineoplásicos. A implantação de duas sondas de microdiálise em um único tumor permitiu a avaliação dessas diferenças.

Após análise não-compartimental, os dados obtidos na avaliação farmacocinética do etoposídeo foram utilizados no desenvolvimento de modelo farmacocinético populacional (popPK) com o objetivo de descrever simultaneamente as concentrações do fármaco no plasma e nas duas regiões do tumor. O modelo de 4 compartimentos compreendendo distribuição saturável (cinética de Michaelis-Menten) nos compartimentos tumorais a partir do compartimento central e eliminação de primeira ordem foi o mais adequado para modelar simultaneamente os três perfis de concentração-tempo do etoposídeo (Capítulo 2, Figuras 3 e 4). O modelo popPK desenvolvido nesta etapa do trabalho pode ser aplicado na construção de modelos PK/PD para o etoposídeo, simulando concentrações plasmáticas e intratumorais do fármaco para outras doses não investigadas.

A etapa seguinte do projeto envolveu a realização dos experimentos de farmacodinâmica do etoposídeo. A avaliação do efeito antitumoral do etoposídeo foi conduzida através da medida do tumor de W256 em ratos Wistar não tratados e tratados que receberam etoposídeo pela via iv *bolus* em dois esquemas posológicos: 5 mg/kg/d durante 8 dias ou 10 mg/kg/d durante 4 dias. O volume dos tumores foi monitorado diariamente durante 30 dias. O tratamento com dose mais baixa por tempo mais prolongado (5 mg/kg-8d) foi mais efetivo do que o regime utilizando dose mais alta do antineoplásico por um período menor (10 mg/kg-4d), apesar da mesma dose total (40 mg/kg) ter sido utilizada, demonstrando que o etoposídeo apresenta efeito antitumoral dependente do regime de administração. Essa dependência corrobora com o que é descrito na literatura para o etoposídeo na clínica (SLEVIN et al., 1989; LIU & JOEL, 2003). O efeito dependente do regime de administração para fármacos inibidores da topoisomerase II como o etoposídeo tem

sido relacionado à atividade variável da topoisomerase II durante o ciclo celular e também ao fato do fármaco ser eliminado rapidamente do organismo (tratamentos curtos), permitindo o reparo do DNA das células tumorais. Dessa forma, tratamentos prolongados são mais efetivos contra as células tumorais (HANDE, 1996; JOEL & SLEVIN, 1994).

Esses dados foram utilizados para o desenvolvimento de um modelo populacional PK/PD para descrever o efeito temporal do etoposídeo no crescimento do tumor W256 no qual os perfis de concentração-tempo no plasma e periferia do tumor foram descritos usando o modelo popPK previamente desenvolvido. Para a modelagem PK/PD foram utilizadas somente as concentrações livres teciduais na periferia do tumor, pois esta região apresentou uma maior densidade de células tumorais viáveis, sendo a região de interesse para a ação do fármaco.

Para desenvolver o modelo PK/PD utilizou-se como base o modelo de Simeoni TGI descrito previamente na literatura (SIMEONI et al., 2004), que é o modelo mais popular presente na literatura para descrever a inibição do crescimento tumoral *in vivo*. O modelo foi modificado através da introdução de uma função  $E_{max}$  inibitória permitindo descrever o efeito antitumoral dependente do regime de administração do fármaco utilizando tanto concentrações plasmáticas totais ou livres intratumorais.

No modelo Simeoni TGI original, a redução na taxa de crescimento do tumor causada pelo fármaco, ou seja, o efeito é diretamente proporcional à concentração do fármaco por meio de um fator de proporcionalidade denominado  $k_2$ , que descreve a potência deste fármaco. No presente trabalho, no entanto, essa relação não é válida, pois foi observado que o efeito do etoposídeo é dependente do regime de administração, resultando em uma potência variável ( $k_{2\text{variável}}$ ). Dessa forma, o efeito é proporcional à concentração do fármaco por meio de um fator de proporcionalidade  $k_{2\text{variável}}$ , onde quanto maior a concentração, menor a potência do composto. Através do modelo Simeoni TGI- $E_{max}$ , foi possível explicar o menor efeito obtido quando o regime de 10 mg/kg-4d foi administrado comparado-se ao regime de 5 mg/kg-8d.

Além disso, a modelagem resultou em um maior  $k_{2\text{max}}$  (potência máxima) quando as concentrações livres intratumorais foram utilizadas ( $25,8 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ) em comparação com as concentrações plasmáticas totais ( $12,6 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ). O

maior  $k_{2max}$  determinado com as concentrações livres intratumorais deve-se à exposição do etoposídeo livre no tumor ser 82% menor do que a exposição plasmática total. Essa diferença no  $k_{2max}$  dependendo do *input* PK mostra que as concentrações totais plasmáticas podem não ser adequadas para substituir as concentrações livres no tumor. Quando candidatos a antitumorais são comparados utilizando as concentrações plasmáticas como *input* PK, o modelo PK/PD pode prever uma potência equivocada se esses candidatos possuírem uma diferença relevante na penetração tumoral, levando à seleção inadequada do composto mais promissor.

Os resultados obtidos nesta tese mostram que o modelo populacional PK/PD Simeoni TGI- $E_{max}$  descreveu adequadamente o efeito dependente do regime de administração do etoposídeo utilizando concentrações plasmáticas totais e livres intratumorais obtidas em modelo de tumor W256 em ratos Wistar. Os resultados sugerem que o uso das concentrações livres no tumor como *input* PK para a modelagem PK/PD pode proporcionar um melhor entendimento da relação farmacocinética e farmacodinâmica e das razões da ineficácia dos fármacos do que os modelos PK/PD tradicionais, que são baseados nas concentrações plasmáticas totais.



**CONCLUSÕES**

---



- A metodologia bioanalítica por HPLC/UV desenvolvida e validada mostrou-se adequada para a quantificação do etoposídeo nas amostras de plasma e microdialisado de tumor, podendo ser aplicada para investigação farmacocinética do fármaco;
- O estudo de microdiálise possibilitou mostrar que a penetração do etoposídeo no tumor de W256 de ratos é maior na periferia do que no centro do tumor, permitindo um melhor entendimento da distribuição intratumoral do fármaco;
- O modelo popPK desenvolvido permitiu modelar simultaneamente as concentrações plasmáticas totais livres intersticiais do etoposídeo nas regiões periférica e central do tumor, podendo ser utilizado para simular concentrações intratumorais do fármaco para doses não investigadas;
- O modelo PK/PD populacional Simeoni TGI- $E_{max}$  mostrou-se adequado para descrever o efeito antitumoral do etoposídeo dependente do regime de administração, utilizando tanto concentrações plasmáticas totais quanto concentrações livres intersticiais na periferia do tumor.



**REFERÊNCIAS GERAIS**

---



1. AL-ABD, A. M. Pharmacokinetics of doxorubicin after intratumoral injection using a thermosensitive hydrogel in tumor-bearing mice. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 101–107, 2010.
2. ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
3. ANISIMOV, V. N. et al. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 807-819, 2005.
4. ARBUCK, S.G. et al. Etoposide pharmacokinetics in patients with normal and abnormal organ function. **Journal of Clinical Oncology**, v. 4, n. 11, p. 1690-1695, 1986.
5. AZRAK, R. G. et al. Irinotecan pharmacokinetic and pharmacogenomics and neck xenograft tumors alterations induced by methylselenocysteine in human head. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, p. 843-854, 2005.
6. BENDER, B. C.; SCHINDLER, E.; FRIBERG, L. E. Population pharmacokinetic pharmacodynamic modelling in oncology: a tool for predicting clinical response. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2015.
7. BLÖCHL-DAUM, B. et al. Measurement of extracellular fluid carboplatin kinetics in melanoma metastases with microdialysis. **British Journal of Cancer**, v. 73, p. 920-4, 1996.
8. BRASIL. Estimativas 2014: **incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126p.
9. BRÚ, A. et al. The Universal Dynamics of Tumor Growth. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 2948–2961, 2003.
10. BUENO L. et al. Semi-mechanistic modelling of the tumour growth inhibitory effects of LY2157299, a new type I receptor TGF-beta kinase antagonist, in mice. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 142–50, 2008.
11. BURGIO, D. E.; GOSLAND, M. P.; MCNAMARA, P. J. Modulation effects of cyclosporine on etoposide pharmacokinetics and CNS distribution in the rat utilizing microdialysis. **Biochemical Pharmacology**, v.51, p. 987 – 992, 1996.
12. BURGIO, D. E.; GOSLAND, M. P.; MCNAMARA, P. J. Effects of P-glycoprotein modulators on etoposide elimination and central nervous system distribution. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 3, p. 911-917, 1998.
13. CHAURASIA, C. S. et al. AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, 2007.

14. CLARET, L. et al. Model-based prediction of phase III overall survival in colorectal cancer on the basis of phase II tumor dynamics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 4103–4108, 2009.
15. COLIN, P. et al. A model based analysis of IPEC dosing of paclitaxel in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 2876-86, 2014.
16. DEL BENE, F. et al. A model-based approach to the in vitro evaluation of anticancer activity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, p. 827–836, 2009.
17. DERENDORF, H. & MEIBOHN, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) relationship: concepts and perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 1999.
18. DEVINENI, D.; KLEIN-SZANTO, A.; GALLO, J. M. Uptake of temozolomide in a rat glioma model in the presence and absence of the angiogenesis inhibitor TNP-470. **Cancer Research**, v. 56, p. 1983-7, 1996.
19. EKSTRØM P. O. et al. Determination of extracellular methotrexate tissue levels by microdialysis in a rat model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 37, p. 394–400, 1996.
20. ERIKCI, A. A. et al. Acute myeloid leukemia complicating multiple myeloma: a case successfully treated with etoposide, thioguanine, and cytarabine. **Clinical Lymphoma and Myeloma**, v. 9, p. E14 -5, 2009.
21. EVANS, W.E. et al. Pharmacokinetics of Teniposide (VM26) and etoposide (VP16-213) in children with cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 7, p. 147-150, 1982.
22. FDA, **End-of-phase 2a meetings**. FDA guidance for Industry; September 2009.
23. FRIBERG, L. E. et al. Semiphysiological model for the time course of leukocytes after varying schedules of 5-fluorouracil in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295; p. 734-40, 2000a.
24. FRIBERG, L. E. et al. Models of schedule dependent haematological toxicity of 20-deoxy-20-methylidenecytidine (DMDC). **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, p. 567-74, 2000b.
25. FRIBERG, L. E. et al. Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, p. 4713-21, 2002.
26. FRIBERG, L. E. Microdialysis: A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modelling of Anticancer Drugs: **Haematological Toxicity and Tumour Response in Hollow Fibres**, Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala, 2003.

27. FRIBERG, L. E.; SANDSTRÖM, M.; KARLSSON, M. O. Scaling the time-course of myelosuppression from rats to patients with a semi-physiological model. **Investigational New Drugs**, v. 6, p. 744-53, 2010.
28. GOBBURU, J. V. Pharmacometrics 2020. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, p. 151S-157S, 2010.
29. GOTETI, K. et al. Preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamics models to predict synergistic effects of co-administered anti-cancer agents. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, p. 245–254, 2010.
30. GUPTA, S. C. et al. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 508-517, 2013.
31. HANDE, K. R. The importance of drug scheduling in cancer chemotherapy: etoposide as an example. **Stem Cells**, v.14, p. 18-24, 1996.
32. HANSSON, E. K. et al. PKPD Modeling of the Angiogenic Factors VEGF, sVEGFR-2, sVEGFR-3 and sKIT following Sunitinib Treatment in GIST. **PAGE. Abstracts of the Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe**, 2011.
33. HANSSON, E. K. & FRIBERG, L. E. The shape of the myelosuppression time profile is related to the probability of developing neutropenic fever in patients with docetaxel-induced grade IV neutropenia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, 881-90, 2012.
34. HOLDHOFF, M. et al. Intratumoral concentrations of imatinib after oral administration in patients with glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-oncology**, v. 97, p. 241-245, 2010.
35. HOLTHUIS, J. J. M. et al. Pharmacokinetics of High Dose Etoposide (VP16-213). **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 7, p. 147-150, 1986.
36. HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e Relação Estrutura-Atividade de Moduladores, **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.
37. HUNZ, M. et al. Plasma and tissue pharmacokinetics of epirubicin and paclitaxel in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced primary breast cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, p. 659-68, 2007.
38. HURTADO F. K. et al. Population pharmacokinetic modeling of the unbound levofloxacin concentrations in rat plasma and prostate tissue measured by microdialysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 678-686, 2014.
39. ISSELL, B. F. & CROOKE, S. T. Etoposide (VP-16-213). **Cancer Treatment Reviews**, v. 6, p.107-124, 1979.

40. JOEL, S. P. & SLEVIN, M. L. Schedule-dependent topoisomerase II-inhibiting drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 34 Suppl:S84-8, 1994.
41. JOEL, S. Antitumour treatment The clinical pharmacology of etoposide: an update. **Cancer Treatment Reviews**, v. 22, n. 3, p. 179-221, 1996.
42. JOEL, S. P. et al. Predicting Etoposide Toxicity: Relationship to Organ Function and Protein Binding. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, p. 257-267, 1996.
43. JONES, P.S. & JONES, D. New regulatory framework for cancer drug development. **Drug Discovery**, v. 17, p. 227–231, 2012.
44. JUSKO, W. J. Pharmacodynamics of chemotherapeutic effects: dose-time-response relationships for phase-nonspecific agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 892-895, 1971.
45. JUSKO W. J. A pharmacodynamic model for cell-cycle-specific chemotherapeutic agents. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 1, p. 175-200, 1973.
46. KARLSSON, M. O. et al. A population model for the leukopenic effect of etoposide. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, p. 325-34, 1995.
47. KOCH, G. et al. Modeling of tumor growth and anticancer effects of combination therapy. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 36, p. 179-197, 2009.
48. KONINGS, I. R. et al. Application of prolonged microdialysis sampling in carboplatin-treated cancer patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, p. 509–516, 2009.
49. KUMMAR, S. Compressing drug development timelines in oncology using phase '0' trials. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 131-139, 2007.
50. LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3145-67, 2008.
51. LI, C. Transgenic Models of Neurodegenerative Disease. In: Hof, P. R. and Mobbs, C. V. **Handbook of the neuroscience of aging**. Academic, London, 2009.
52. LINDAUER, A. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of biomarker response to sunitinib in healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, p. 601-608, 2010.
53. LIU, W. M. & JOEL, S. P. The schedule-dependent effects of etoposide in leukaemic cell lines: a function of concentration and duration. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 291-296, 2003.

54. LOBO, E.D. & BALTHASAR, J.P. Pharmacodynamic modeling of chemotherapeutic effects: application of a transit compartment model to characterize methotrexate effects in vitro. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 4, p. 212–222, 2002.
55. LUO, F. R. et al., Dasatinib (BMS-354825) pharmacokinetics and pharmacodynamic biomarkers in animal models predict optimal clinical exposure. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 23, p. 7180–7186, 2006.
56. MAGNI, P. et al. A mathematical model to study the effects of drugs administration on tumor growth dynamics, **Mathematical Biosciences**, v. 200, p. 127–151, 2006.
57. MELLO, M. V. T. C. & MENCARINI, A. C. M. **Epidemiologia do câncer**. In: GUIMARÃES, J.L.M., ROSA, D.D. (Org.). Rotinas em Oncologia. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008.
58. MENDONÇA, L.M. **Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12**. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2008.
59. MERLIN, J. J. P. et al., Biochemical estimations of multidrug resistance (ferulic acid and paclitaxel) in non-small cells lung carcinoma cells in vitro. **Biomedicine and Aging Pathology**, v. 3, p. 47-50, 2013.
60. MWANDA, W. O. et al. Dose-modified oral chemotherapy in the treatment of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma in East Africa. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, p 3480-3488, 2009.
61. NAIK, A. & WILLIAMS, D. A., Pharmacokinetic analysis of etoposide and etoposide phosphate in rat using in vivo microdialysis and microbore HPLC. **Pharmaceutical Research**, v. 13, 1996.
62. NATURE (Publishing Group). Cancer multidrug resistance. **Nature Biotechnology**, v. 18, IT18 - IT20, 2000, doi:10.1038/80051.
63. NERINI IF et al. Intratumor heterogeneity and its impact on drug distribution and sensitivity. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 224-238, 2014.
64. O'CONNOR, R. The pharmacology of cancer resistance. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1267-1272, 2007.
65. PASTAKIA, D. et al. Comparison of intravenous microdialysis sampling to standard blood sampling to determine free etoposide exposure in non-human primates. **Cancer Research**, AACR 101st Annual Meeting, v. 70, Washington, DC, 2010.

66. PLOCK, N. & KLOFT, C. Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25 p. 1–24, 2005.
67. POGGESI, I. et al. Population modeling of tumor growth in untreated xenografted mice. **Abstracts of the Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe**, Uppsala PAGE 13, Abstract 535, 2004. [<http://www.page-meeting.org/?abstract=535>].
68. ROCHE, S. **Development and application of novel analytical methods for molecularly targeted cancer therapeutics**, Ph.D. Thesis, National Institute for Cellular Biotechnology, Dublin City University, 2011.
69. ROCCHETTI M. et al. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model for predicting tumour growth inhibition in mice: a useful tool in oncology drug development. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 265–268, 2005.
70. ROCCHETTI, M. et al. Predicting the active doses in humans from animal studies: A novel approach in oncology. **European Journal of Cancer**, v. 43, p. 1862–1868, 2007.
71. RODRIGUES, D. S. **Modelagem matemática em câncer: dinâmica angiogênica e quimioterapia anti-neoplásica**, Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.
72. SANDSTRÖM, M. et al. Population analysis of the pharmacokinetics and the haematological toxicity of the fluorouracil-epirubicin-cyclophosphamide regimen in breast cancer patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 58, p. 143–56, 2006.
73. SANI, S. N. Application of microdialysis to characterize drug disposition in pharmacokinetic studies: The case of methotrexate. Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, UMI Dissertations Publishing, 2009.
74. SATO, H. et al. Microdialysis assessment of microfibrillar collagen containing a P-glycoprotein-mediated transport inhibitor, cyclosporine A, for local delivery of etoposide. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n.10, p. 1565-1569, 1996.
75. SCHURIG, J. E.; FLORCZYK, A. P.; BRADNER, W.T. The mouse as a model for predicting the myelosuppressive effects of anticancer drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 16, p. 243-6, 1986.
76. SIMEONI, M. et al. Predictive Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Tumor Growth Kinetics in Xenograft Models after Administration of Anticancer Agents. **Cancer Research**, v. 64, p. 1094-1101, 2004.
77. SIMEONI, M. et al. Modeling of human tumor xenografts and dose rationale in oncology. **Drug Discovery Today. Technologies**, v. 10, p. 365-72, 2013.

78. SIRISANGTRAGUL, C. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraventricularly administered etoposide in brain tumour patients**. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Thailand, 2006.
79. SLEVIN, M. L. et al. A randomized trial to evaluate the effect of schedule on the activity of etoposide in small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, p.1333-1340, 1989.
80. SLEVIN, M. L. The clinical pharmacology of etoposide. **Cancer**, v. 67, p. 319-29, 1991.
81. SONDHI, S.M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 45 p. 555–556, 2010.
82. STAAB, A. et al. Modeling and Simulation in Clinical Pharmacology and Dose Finding. **Open Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 2, 2013.
83. STEIMER, J. L. et al. Modelling the genesis and treatment of cancer: The potential role of physiologically based pharmacodynamics. **European Journal of Cancer**, v. 46; p.21-32, 2010.
84. SUN, Y. N. & JUSKO, W. J. Transit compartments versus gamma distribution function to model signal transduction processes in pharmacodynamics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 732-737, 1998.
85. SUNG, J. H.; DHIMAN, A.; SHULER, M. L. A Combined Pharmacokinetic–Pharmacodynamic (PK–PD) Model for Tumor Growth in the Rat with UFT Administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 5, 2009.
86. TAS, F. et al. Oral etoposide as first-line therapy in the treatment of patients with advanced classic Kaposi's sarcoma (CKS): a single-arm trial (oral etoposide in CKS). **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, p. 789 – 792, 2013.
87. TERRANOVA, N. & MAGNI, P. TGI-Simulator: a visual tool to support the preclinical phase of the drug discovery process by assessing in silico the effect of an anticancer drug. **Computer Methods and Programs Biomedicine**, v. 105, p. 162-74, 2012.
88. TERRANOVA, N. et al. A predictive pharmacokinetic–pharmacodynamic model of tumor growth kinetics in xenograft mice after administration of anticancer agents given in combination. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, p. 471–482, 2013.
89. TRANCHAND, B. et al. A limited-sampling strategy for estimation of etoposide pharmacokinetics in cancer patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 43, p. 316-322, 1999.

90. ULICH, T. R. & DEL CASTILLO, J. The hematopoietic and mature blood cells of the rat: their morphology and the kinetics of circulating leukocytes in control rats. **Experimental Hematology**, v.19, p.639-48, 1991.
91. VAN KESTEREN, C. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic guided trial design in oncology. **Investigational New Drugs**, v. 21, p. 225-41, 2003.
92. VINEIS P & WILD C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. **Lancet**, v. 383, p. 549-557, 2014.
93. WALGREN, R. A. & SLAPAK, C. A. **Failure Modes in Anticancer Drug Discovery and Development**. In: Stephen Neidle ed. *Cancer Drug Design and Discovery (Second Edition)*, 567-581, 2014.
94. WALLIN, J. W. et al. Model-Based Neutrophil-Guided Dose Adaptation in Chemotherapy: Evaluation of Predicted Outcome with Different Types and Amounts of Information. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 2343-242, 2009.
95. WANG, Y. et al. Elucidation of relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer patients can aid early decision making in clinical drug development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, p. 167–174, 2009.
96. WEI, Y. H. et al. Microdialysis: a Technique for Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies of Oncological Drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 631-640, 2009.
97. WHITE M. C. et al. Cancer prevention for the next generation. **Journal of Adolescent Health**, v. 52, 2013.
98. WHO - International Agency for Research on Cancer; GLOBOCAN 2012, **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx), accessed on 28/04/2014.
99. WONG, C. C.; CHENG, K. W.; RIGAS, B. Preclinical predictors of anticancer drug efficacy: critical assessment with emphasis on whether nanomolar potency should be required of candidate agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, p. 572-578, 2012.
100. WOO, K. B.; BRENKUS, L. B.; WIIG, K. M. Analysis of the effects of antitumor drugs on cell cycle kinetics. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 59, p. 847-60, 1975.
101. YAMAZAKI, S. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of biomarker response and tumor growth inhibition to an orally available cMet kinase inhibitor in human tumor xenograft mouse models. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 7, p. 1267–1274, 2008.

102. YAMAZAKI, S. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of crizotinib for anaplastic lymphoma kinase inhibition and antitumor efficacy in human tumor xenograft mouse models. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, p. 549-57, 2012.
103. YOU, B. Etoposide pharmacokinetics and survival in patients with small cell lung cancer: A multicentre study. **Lung Cancer**, v. 62, p. 261-272, 2008.
104. ZANDVLIET, A. S. et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to support treatment optimization of combination chemotherapy with indisulam and carboplatin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, p. 485-497, 2008.
105. ZHOU, Q. & GALLO, J. M. In Vivo Microdialysis for PK and PD Studies of Anticancer Drugs. **The AAPS Journal**, v. 7, 2005.
106. ZHOU, Q. et al. Preclinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Metronomic and Conventional Temozolomide Dosing Regimens. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, p. 265–275, 2007.



## ANEXO

Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS).



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 22302

**Título:** MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA (PK/PD) DE ANTITUMORAIS INIBIDORES DA TOPOISOMERASE

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/09/2011

ANDREIA BUFFON - pesquisador desde 01/09/2011

Maiara Cássia Pigatto - Aluno de Doutorado desde 01/09/2011

DANIELE LENZ MOSSMANN - Aluno de Graduação desde 02/04/2012

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 02/04/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar, no Prédio da Reitoria, Campus Central da UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 206 ratos machos Wistar e 215 camundongos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quarta-Feira, 11 de Abril de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO  
Coordenador da comissão de ética