

## Capítulo 4

### Ensaio Pré-Clínicos

Kalina Pessoa Daniel de Sousa

Joelmir Lucena Veiga da Silva

#### Introdução

Estudos pré-clínicos ou de fase 0, também são denominados como “estudos investigatórios” e surgiram com o intuito de melhorar a eficiência e eficácia do desenvolvimento de novos fármacos. Porém, devido sua característica de ser um processo dinâmico e complexo, existem diversos fatores que contribuem para o seu fracasso, desde o descobrimento até sua comercialização, dentre eles destacam-se a escassez de biomarcadores para validação de um novo composto como também a ausência de previsibilidade dos estudos pré-clínicos em modelos animais (COSTA, 2018).

Os estudos pré-clínicos são realizados com o objetivo de avaliar, descobrir e categorizar os potenciais efeitos adversos e tóxicos dos medicamentos para o ser humano, podendo ser realizados *in vivo*, *in vitro* e *em ex vivo*. Sendo agrupados em três categorias: os farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos. Porém, para que ocorra o desenvolvimento de novos fármacos, são necessárias normas regulamentadoras, um processo complexo e delicado, há exemplo a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) criada em 1995 com intuito a promoção e prevenção da saúde humana e animal, através de avaliações rigorosas, supervisões e controles de medicamentos para o uso em humanos e animais (EMA, 2013). No Brasil, Todos os resultados de testes envolvendo animais apresentados à Anvisa devem ser conduzidos de acordo com a legislação nacional, as Boas Práticas de Laboratório (BPL) - OECD Principles of Good Laboratory Practice; HANDBOOK: GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP) (*Quality practices for regulated non-clinical research and development*) da OMS (ANVISA, 2017).

Para se obter uma molécula potencial que ocorra interação entre os receptores de membrana e substância alvo, é preciso reconhecer todos os aspectos da molécula em questão, desde suas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, biotransformação e excreção - ADME) ou seja, todo o trajeto que o fármaco fará no organismo, sendo dependente de fatores relacionados com o paciente, bem como as propriedades químicas (estabilidade, solubilidade, questões de formulação e sua segurança). Antes de serem administrados em seres humanos, todos os fármacos passam por uma fase de teste quanto a sua toxicidade geral, dentre eles a

carcinogenicidade, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva, uma vez que *Todos os fármacos são tóxicos em algum indivíduo em alguma dose*, devido esses aspectos são necessários estudos de segurança pré-clínicos e seus testes de toxicidade, a fim de definir qual seria o limite entre o índice terapêutico e malefícios de um novo fármaco. Normalmente são testes realizados em animais como, por exemplo, os roedores e não roedores, respectivamente camundongos e coelhos. Quando necessário, são utilizados testes em *in vitro* e *ex vivo*, com o intuito de poupar os animais e diminuir os custos, entretanto o processo de seleção de espécies é realizado através da semelhança entre as espécies, quanto a morfologia, fisiologia e bioquímica (Quadro 2).

<b>Espécie</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Desvantagem</b>
Camundongo ( <i>Mus musculus</i> ) /rato ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Fácil manutenção, manuseio e observação Ciclos de vida curtos Prole Numerosa/ fácil reprodução Múltiplas vias de administração	Vivem em ambientes artificiais Doenças induzidas artificialmente Menor volume corrente de sangue Requer método coorte para avaliação de toxicocinéticos
Cão (Raça Beagle)-( <i>Canis lupus familiaris</i> )	Vive em ambiente semelhante aos humanos Animais dóceis Múltiplas vias de administração Fácil reprodução	Custo manutenção
Macaco ( <i>Primates</i> )	Grau de semelhança aos humanos Múltiplas vias de administração	Técnica específica de manuseio
Coelho ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Alta sensibilidade	Maior susceptibilidade ao estresse
Porco ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Pode utilizar a via oral como administração	Custo de manutenção Técnica específica de manuseio

**Quadro 2** - Vantagens vs. Desvantagem quanto ao uso de animais em estudos de fase 0. Fonte: Adaptado de Denny; Stewart (2013).

De acordo com Marchetti e Schellens 2007, os estudos de fase 0, são utilizados com o intuito de identificar de forma mais rápida e precoce as possíveis moléculas fundamentais para o uso de forma experimental nos ensaios clínicos ou fase 1, fornecendo

um instrumento potencialmente útil para a descoberta de novos medicamentos (MARCHETTI; SCHELLENS, 2007)

Antes que um novo fármaco seja testado em humanos, isto é, ir para a fase clínica é necessário estar fundamentada na experimentação prévia, realizada em laboratórios, utilizando-se animais ou outros modelos experimentais quando pertinente (BRASIL, 2012), que será tratado neste capítulo.

Caso seja aprovado para comercialização no Brasil, o novo medicamento deve seguir todas as normas da Resolução N° 200 (ANVISA, 2017), onde dispõe de critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípio ativo sintético e semissintético, classificado como novo.

### **Estudos Pré-clínicos ou Fase 0**

James (2015) e Gawai et al. (2017), ambos referem que os principais objetivos e metas são determinados através do estabelecimento das ações *MoA Drugs Decipion* (MoA), avaliação da farmacocinética (PK), farmacodinâmica (PD), efeito terapêutico e possíveis eventos adversos, como também a determinação da sua faixa de dose, sendo etapas importantes e imprescindíveis, pois a partir de toda essa análise de dados são realizados estudos clínicos de fase 1 com o intuito da realização de testes em seres humanos (GAWAI et al., 2017).

Basicamente, a etapa pré-clínica analisa a segurança e a eficácia dos fármacos, onde são realizados os seguintes testes (PIERONI et al., 2009):

1. Teste de segurança;
2. Teste de eficácia.

### **Testes de segurança**

**Testes toxicológicos** - Tem como objetivo obter informações que levem a garantia de segurança dos novos compostos, onde serão utilizados em estudos de fase clínica e depois ocorrerá sua comercialização. Essa fase requer várias agências reguladoras e segue critérios rígidos e específicos que normalmente diferem entre as regiões. A Anvisa usa o termo “estudos não clínicos” na sua guia específica sobre os estudos de toxicologia e segurança farmacológica que são necessários para o desenvolvimento de medicamentos no Brasil (ANVISA, 2013). Neste caso, os estudos não clínicos de segurança propostos envolvem os estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de

estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética. Apesar da Anvisa apresentar o guia para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos, caso o pesquisador/instituição consiga comprovar a segurança desses fármacos por outros estudos científica e tecnicamente mais viáveis, os dados apresentados poderão ser avaliados pela ANVISA. O uso de métodos alternativos *in vitro* em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente são recomendados (ANVISA, 2013). A partir dos dados avaliados nessa fase, são demonstrados os intervalos terapêuticos que serão utilizados nos estudos clínicos e seus potenciais efeitos adversos. De acordo com os dados obtidos nos testes *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* são avaliados cinco parâmetros, a dose máxima possível, máxima tolerada, dose letal, dose limiar e a dose responsável pela saturação do órgão alvo (BRAGA et al., 2012). No caso de medicamentos fitoterápicos, existe a Resolução Nº 90 (ANIVSA, 2004) específica para este tipo de medicamento. Os testes toxicológicos são o principal componente do desenvolvimento pré-clínico, constituindo, em média, 50% dos custos totais (KREGGER; FELDMAN, 2004).

**Química bioanalítica** - mensura a presença de compostos na droga ou a existência de componentes moleculares em materiais como fluidos ou tecidos, para melhor entendimento dos testes toxicológicos.

### **Testes de eficácia**

**Análise farmacológica** - Possui como característica a avaliação da farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e da farmacodinâmica. Normalmente são avaliados dois possíveis fármacos, onde serão categorizados suas vantagens e desvantagens e ao final será selecionado um agente de maior benefício. Nessa fase, as doses são mais elevadas do que o estudo de microdosagem ou de imagem, essa fase tem como objetivo principal determinar qual seria a dosagem mais segura e máxima permitida, através dos estudos de toxicologia pré-clínica (GUPTA et al., 2011).

**Análise do produto e fabricação** - análise química dos compostos em relação a estabilidade, pureza e aceitação em um processo de produção.

### **Tipos de testes farmacológicos**

#### **Abordagem *In vivo***

São realizados através das análises de metabólitos presentes na corrente sanguínea, sistema urinário e nas fezes dos animais selecionados (BRAGA et al., 2012). Hoje,

existem vários métodos que são utilizados para a triagem *in vivo*, tais como *Rapid Rat oral PK screen* e o *cassete*. Ambos foram desenvolvidos com o intuito de serem aplicados e avaliados para estudar a estabilidade metabólica (NEVES et al., 2015). Do inglês *High Throughput Screening*, o método cassete permite avaliar de maneira concomitante diversos compostos. Conhecido também como o método de alta produtividade permite examinar aproximadamente 300 mil compostos por dia, possuindo como vantagem principal a redução do uso de animais, em contrapartida, às vezes ocorrem interações medicamentosas, resultando em falso negativo e ou positivos (TECNOLOGIAS DE PESQUISA, 2018). Já o *Rapid Rat Oral Pk Screen* ocorre através da administração de apenas um composto em pelo menos dois animais diferentes, onde a seguir será realizado coletas sanguíneas e seus dados serão conduzidos por um método analítico ou seja, um método comparativo (BRAGA et al., 2014).

### **Abordagem *In vitro***

São agrupadas em até três categorias distintas. A primeira através de técnicas de cultura de tecido hepático, tem como vantagem a possibilidade de ser utilizada para analisar diversos fármacos diferentes, também possui a opção de ser criopreservada se tornando viável por até 4 semanas. Porém, mesmo com a criopreservação, estudos demonstram que há diminuição da função do citocromo P450, a principal enzima responsável pelo metabolismo dos fármacos (BRANDON et al., 2003). A segunda categoria se encontra intimamente ligada com os estudos de estabilidade metabólica, utilizando frações celulares, possuindo maior preferência devido sua facilidade de preparo e disponibilidade. Sua principal diferença é quanto ao seu tempo de armazenamento, estudos demonstram que podem ser armazenadas por meses sem prejuízo nenhum de atividade, porém as vezes algumas enzimas se tornaram frágeis, devido sua diminuição da integralidade celular. Já a última seria caracterizada pelo seu uso de fungos que são capazes de transformar reações metabólicas simples através de sistema de biotransformação (NEVES et al., 2015).

### **Tipos de testes Toxicológicos**

#### **Toxicidade Aguda - dose única**

Antigamente era considerada como a primeira etapa do teste de avaliação de segurança de toxicidade, onde era caracterizado por realizar o teste *in vivo* através do ensaio de toxicidade por dose única (aguda), devendo ser conduzida com pelo menos duas espécies de mamíferos, incluindo obrigatoriamente uma espécie não roedora, de ambos os sexos (CHMP, 2010) . Era administrada uma dose ou doses fracionadas durante 24 horas,

através de duas vias de administração: a pretendida para administração em humanos (oral, dérmica, ocular ou inalatória) e a endovenosa. Porém, é necessária a determinação da dose limite, sendo aquela que não alcance uma toxicidade letal ou uma dose de até 1000mg/kg/dia. O período de acompanhamento era em média de 14 dias após a administração da droga, sendo os animais observados por pelo menos duas vezes ao decorrer do dia. Este estudo tem como finalidade avaliar a mortalidade, dose letal 50 (DL50) ou concentração letal (CL50), latência, duração, sinais clínicos e patologias clínicas. Porém, desde Junho de 2008, este teste não é muito utilizado, devido a sua capacidade de também ser observado em outros ensaios de toxicidade (PATRICIAANDREOTTI, 2013).

### **Toxicidade de doses repetidas**

Estes estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir dos dados obtidos é possível ter informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do NOEL e NOAEL. Devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. As espécies devem ser selecionadas com base em sua relevância para a extrapolação de dados para seres humanos. Deverá ser utilizada a via de administração utilizada deverá ser aquela em que a droga será administrada em humanos, mas se a absorção em animais for limitada em relação ao homem, também uma via parenteral. As doses utilizadas em estudos de administrações repetidas geralmente são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses. Geralmente 3 doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e não-roedores. No geral, o período de observação deve ser o mesmo da intervenção na fase clínica (ANVISA, 2013).

### **Genotoxicidade**

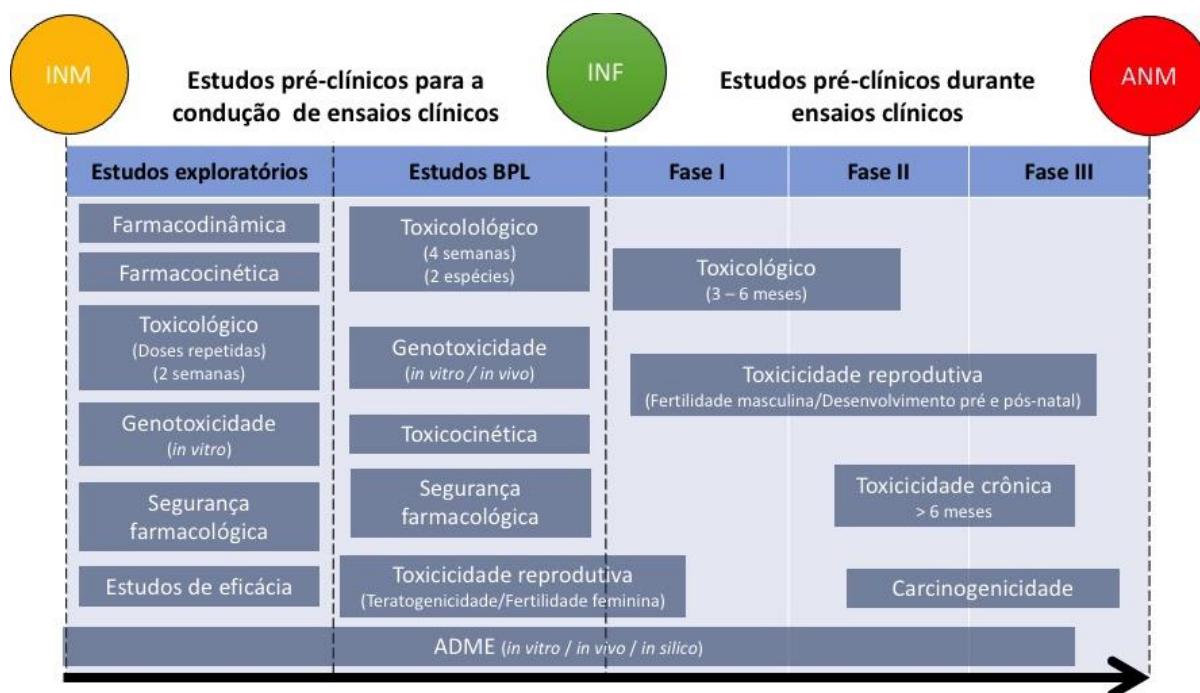
São testes realizados em *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de investigar e detectar de forma precoce as possíveis mutações gênicas e alterações cromossômicas, através da mutação no DNA que podem ser numéricas ou estruturais. São estudos de longa duração devido sua alta complexidade, aonde normalmente só vão se expressar ao longo do tempo e possui como característica as manifestações sobre a formas tumorais. Os ensaios *in vitro*

devem ser realizados na presença e ausência da ativação metabólica, já o *in vivo* é recomendado o uso roedores, preferencialmente os machos. Possui como recomendação uma dose de 5mg para testes em bactérias, porém quando utilizado em mamíferos as recomendação são de 0,5mg/ml. É considerado um estudo de suporte, devendo ser concluído antes da realização dos estudos de fase 2 em humanos (MEDICINES AGENCY, 2012).

### **Carcinogenicidade**

É um estudo de longo prazo e tem como objetivo identificar as substâncias potencialmente formadoras de lesões tumorais. Normalmente possui avaliação rigorosa durante um período mínimo de 24 meses em ratos e, 18 meses em camundongos e hamsters, sendo observados através de testes específicos realizados em animais.( ANDREOTTI, 2013). Porém, devido sua alta complexidade existem critérios para sua elaboração, dentre eles quando o novo fármaco indica um potencial mutagênicos e/ou quando ocorre alterações fisiopatológicas. A partir de uma avaliação ampla, é possível determinar os parâmetros como taxa de mortalidade e morbidade, geralmente no início e no final de cada dia, eventos adversos, alterações hematológicas e modificações nos processos de metabolização e excreção (MARONE; HALL; HAYES, 2014).

Por fim, a fase pré-clínica no estudo de um novo medicamento envolve várias etapas, segue as exigências de agências reguladoras nacional e internacionais, varia os tipos de ensaios a depender da finalidade do medicamento, duração de uso, via de administração pretendida, entre outras especificações. A Figura 4 mostra, resumidamente, estas etapas.



**Figura 4 – Etapas de ensaios pré-clínicos no desenvolvimento de novos medicamentos.** BPL: Boas Práticas de Laboratório; INM: Investigação de nova molécula; INF: Investigação de novo fármaco; ANM: Aplicação de novo medicamento; ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção. Fonte: Adaptado de Andrade et al. (2016).

## Referências

ANDRADE, E.L.; BENTO, A.F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S.K.; SCHWANKE, R.C.; SIQUEIRA, J.M.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; CALIXTO, J.B. Non-clinical studies in the process of new drug development – Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 49, n .12, e5646; 2016.

**Agência Europeia de Medicamentos (EMA) | União Europeia.** Disponível em: <[https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/ema\\_pt](https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/ema_pt)>. Acesso em: 13 jun. 2020.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota sobre o uso de animais em estudos pré-clínicos.** 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/anosanteriores/nota-da-anvisa-sobre-o-uso-de-animais-em-estudos-pre-clinicos>. Acesso em: 12 jan 2022.

ANVISA. **Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento De Medicamentos.** Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 90, de 16 de março de 2004. **Guia Para A Realização De Estudos De Toxicidade Pré-Clínica De Fitoterápicos.**

BRAGA, R. et al. Tuning hERG Out: Antitarget QSAR Models for Drug Development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1399–1415; 2014.

BRAGA, R. C. et al. Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for metabolism prediction of 3,4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazine. **Journal of molecular modeling**, v. 18, n. 5, p. 2065–78; 2012.

BRANDON, E. F. A. et al. **An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons** *Toxicology and Applied Pharmacology*. Academic Press Inc; 2003.

BRASIL. **Resolução Nº 466**, de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. Diário Oficial da União nº 12, 13 de junho de 2013.

**Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Questions and answers on the withdrawal of the “Note for guidance on single dose toxicity”**. . [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)>. Acesso em: 24 jun. 2020.

COSTA, N. M. N. **Estudos Clínicos de Fase 0 no contexto dos Ensaio Clínicos: um novo paradigma a considerar?** [s.l: s.n.].

**Estudos IND Exploratórios | FDA**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/exploratory-ind-studies>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

GAWAI, A. A. et al. **Klinik Faz ‘0’ Testleri ya da Yeni İlaç Keşif Araştırmaları Üzerine Bir Derleme** *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, Turkish Pharmacists Association, , 15 abr. 2017.

GUPTA, U. et al. Phase 0 clinical trials in oncology new drug development. **Perspectives in Clinical Research**, v. 2, n. 1, p. 13, 2011.

KREGER, J. FELDMAN, N. **From mice to men: a preclinical outsourcing market update**. Chicago: William Blair & Company, 2004.

MARCHETTI, S.; SCHELLENS, J. H. M. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. *British Journal of Cancer Nature Publishing Group*, , 28 ago. 2007.

MARONE, P. A.; HALL, W. C.; HAYES, A. W. Reassessing the two-year rodent carcinogenicity bioassay: A review of the applicability to human risk and current perspectives. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 108–118; 2014.

MEDICINES AGENCY, E. **ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)>. Acesso em: 24 jun. 2020.

NEVES, B. J. et al. In silico repositioning-chemogenomics strategy identifies new drugs with potential activity against multiple life stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, p. e3435, jan. 2015.

ANDREOTTI, P. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 24 jun. 2020.

Pieroni, J.P.; Capanema, L.X.Lemos; Reis, C.; Souza, J O.B.; Silva, L.G. Terceirização da P&D de medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 29, p. 131-158; 2009.

TECNOLOGIAS DE PESQUISA. **High Throughput Screening - Pharmaceuticals**. Disponível em: <<https://pharma.bayer.com.br/pt/pesquisa-desenvolvimento/tecnologias-tendencias/tecnologias-pesquisa/high-throughput-screening/index.php>>. Acesso em: 16 jun. 2020.