

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA - UNIPAMPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA CLÁUDIA FUNGUETTO RIBEIRO

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA
POPULACIONAL DE CLOZAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS WISTAR

Uruguaiana, maio de 2020

ANA CLÁUDIA FUNGUETTO RIBEIRO

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA
POPULACIONAL DE CLOZAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas *Strictu Sensu*, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr.^a Sandra Elisa Haas

Uruguaiana, maio de 2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

F981m Funguetto-Ribeiro, Ana Cláudia
MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA POPULACIONAL DE
CLOZAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS WISTAR / Ana Cláudia
Funguetto Ribeiro.
84 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2020.
"Orientação: Sandra Elisa Haas".

1. Modelagem Populacional. 2. Nanocarreador. 3.
Antipsicótico. 4. popPK. 5. popPK/PD. I. Título.

ANA CLÁUDIA FUNGUETTO RIBEIRO

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA
POPULACIONAL DE CLOZAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dissertação defendida e aprovada em: 19/05/2020

Banca examinadora:



Prof. Dr^a. Sandra Elisa Haas - UNIPAMPA



Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula - UNIPAMPA



Prof^a. Dr^a. Francine Johansson Azeredo - UFBA

Dedico este trabalho à família,
especialmente aos meus pais Paulo e
Claudete e meus irmãos Lucca e Matteo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Sandra Haas, que me acolheu há pouco mais de dois anos, me incentivou a vencer minhas inseguranças, me fez crescer como pesquisadora, confiou e me mostrou o meu potencial como futura farmacocineticista.

Aos meus pais Paulo e Claudete e irmãos caçulas Lucca e Matteo por todo suporte nesta jornada, que, somando à faculdade, já são mais de 7 anos apoiando minha trajetória acadêmica. Especialmente à minha mãe, que embarca comigo em todas as loucuras e não loucuras dessa vida. E aos manos, espero servir de inspiração para vocês.

Aos meus avós Armando e Josefina, meus segundos pais, pelo carinho e cuidado comigo ao longo dessa trajetória e ao longo da minha vida.

Ao meu namorado Endreo, presente que o mestrado me trouxe. Obrigada por me inspirar todos os dias, por todo carinho, amor e dedicação comigo e conosco. Te amo e amo nossos bebês de quatro patas. Estendo meus agradecimentos aos meus sogros Carla e Ronaldo por me receberem tão bem às nossas idas a Pelotas no decorrer desses dois anos.

À família LabFar, especialmente à Tamara, Renata G. Renata B., Camila, Flávia, Kelly e Felipe presentes pra vida toda! Obrigada por cada mate, riso e troca de conhecimento. Obrigada por cada cinética e quantificação, vocês foram essenciais nessa trajetória!

À Unipampa e aos professores que participaram da minha formação acadêmica. À CAPES por todo suporte financeiro.

Obrigada Deus pelo dom da vida e aos meus anjos da guarda por me protegerem e me guiarem pelos bons caminhos.

Por último, pero no menos importante, gracias a Doña Suzana, mi anfitriona, que me recibió tan bien durante mi estadía en Montevideo y al personal de CEBIOBE - UY, especialmente al Profesor Manuel Ibarra por su paciencia y dedicación a nuestro proyecto, su contribución fue esencial para la realización deste trabajo.

“Quem nunca errou, nunca experimentou nada novo.”

Albert Einstein

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA POPULACIONAL DE CLOZAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS WISTAR

RESUMO: A clozapina (CZP) é um antipsicótico atípico prescrita em casos de esquizofrenia refratária, devido a efeitos adversos graves associados ao seu uso. Também é observada uma farmacocinética variável, ocasionada pela extensa metabolização pré sistêmica, acarretando numa biodisponibilidade que varia de 27 a 47 %. A nanotecnologia vem como uma estratégia promissora para *delivery*, a fim de melhorar a exposição cerebral de fármacos que atuem no sistema nervoso central. O objetivo do presente estudo foi descrever a relação dose-exposição-resposta de ratos machos Wistar tratados com solução de CZP livre ou nanoencapsulada com polissorbato 80 (NCCZP), polietilenoglicol (NCCZP-PEG) ou quitosana (NCCZP-CS), empregando uma abordagem popPK/PD sequencial. Os dados foram coletados de um estudo prévio realizado por (Vieira *et al.*, 2016). O software Monolix® – Lixoft foi utilizado para modelagem dos dados. Primeiro foi realizado a modelagem farmacocinética populacional (popPK) do grupo free CZP e novos compartimentos foram incorporados, a fim de representar a distribuição de NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS. Os dados popPK foram fixados e o parâmetros farmacodinâmicos (PD) foram estimados. Um modelo de dois compartimentos, associado ao modelo proposto para CZP livre descreveu adequadamente o comportamento para NCCZP e NCCZP-PEG. Enquanto NCCZP-CS foi melhor descrita por um modelo de três compartimentos, associado ao modelo proposto para CZP livre. Os resultados demonstraram, que a nanoencapsulação aumentou a distribuição para todos os grupos, sendo maior para NCCZP-PEG. A partir na popPK/PD sequencial, foi observado redução na quantidade de fármaco necessário para obter 50% da resposta máxima (IC_{50}) para todos os grupos nanoencapsulados e um retorno mais lento ao nível basal, especialmente para NCCZP-CS. Em conjunto NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS demonstraram ser mais potentes e terapeuticamente promissores na terapia farmacológica para pacientes com esquizofrenia.

Palavras-chave: esquizofrenia; clozapina; nanocápsula; modelagem populacional; modelo popPK; modelo popPK/PD

POPULATION PHARMACOKINETIC/PHARMACODYNAMIC MODELING OF NANOENCAPSULATED CLOZAPINE IN WISTAR RATS

ABSTRACT: Clozapine (CZP) is an atypical antipsychotic prescribed in cases of refractory schizophrenia due to serious adverse effects associated with its use. Variable pharmacokinetics are also observed, caused by extensive pre-systemic metabolism, resulting in bioavailability ranging from 27 to 47%. Nanotechnology comes as a promising delivery strategy in order to improve brain exposure to drugs that act on the central nervous system. The aim of the present study was to describe the dose-exposure-response relationship of male Wistar rats treated with free or nanoencapsulated CZP solution with polysorbate 80 (NCCZP), polyethylene glycol (NCCZP-PEG) or chitosan (NCCZP-CS), using an sequential population pharmacokinetic/pharmacodynamic (popPK/PD) approach. Data were collected from a previous study by Vieira *et al.* (2016). The Monolix® - Lixoft software was used for data modeling. First, population pharmacokinetic modeling (popPK) of the free CZP group was defined and new compartments were incorporated in order to represent the distribution of NCCZP, NCCZP-PEG and NCCZP-CS. The popPK data were fixed and the pharmacodynamic parameters (popPD) were estimated. A two-compartment model, associated with the proposed model for free CZP, adequately described the behavior for NCCZP and NCCZP-PEG. While NCCZP-CS was best described by a three-compartment model, associated with the model proposed for free CZP. The results showed that nanoencapsulation increased the distribution for all groups, being higher for NCCZP-PEG. From the sequential popPK/PD, a reduction in the amount of drug needed to obtain 50% of the maximum response (IC_{50}) was observed for all groups. Together NCCZP, NCCZP-PEG and NCCZP-CS have been shown to be more potent and therapeutically promising in pharmacological therapy for patients with schizophrenia.

Key-words: schizophrenia; clozapine; nanocapsule; population modeling; popPK model; popPK/PD model

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da clozapina. Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010	23
Figura 1 Representação esquemática dos modelos estruturais finais	47
Figura 2. Perfis plasmáticos individuais e populacionais modelados	48
Figura 3. Gráficos de qualidade de ajuste do modelo popPK final para previsões individuaispara	51
Figura 4. Visual Predictive Check (VPC) do modelo final de popPK baseado em replica dos dados originais	52
Figura 5. Perfis de movimento de cabeça individuais e populacionais modelados ...	56
Figura 6. Gráficos de qualidade de ajuste do modelo popPK/PD final para previsões individuais.....	58
Figura 7. Visual Predictive Check (VPC) do modelo final de popPK/PD baseado em replica dos dados originais	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos populacionais obtidos.....53

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos populacionais obtidos...57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HT2A	Receptor serotoninérgico
-2LL	Log-likelihood
ADME	Acrônimo para os processos farmacocinéticos
AIC	Critério de seleção de Akaike
ANC	Análise não compartimental
AUC	Área sob a curva de concentração-tempo do medicamento no plasma
BAV	Variabilidade entre os animais
BHE	Barreira hematoencefálica
CID-10	Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
Cl	<i>Clearance</i>
CS	Quitosana
CYP	Citocromo P450
CZP	Clozapina
D2	Receptor dopaminérgicos
E_{max}	Efeito máximo
$F_{máx}$	Percentual de liberação máxima
F_{NC}	Taxa de encapsulação
h	Horas
IC_{50}	Concentração plasmática do fármaco que equivale a 50% do efeito máximo
I_{max}	Inibição máxima
Ka	Constante de absorção

K_{fpc}	Constante de retorno do fármaco livre liberado no compartimento periférico para compartimento central
k_r	Coeficiente de liberação
L	Litro
mg	Miligramas
μg	Microgramas
mL	Mililitro
N	Fator de Hill
NCCZP	Nanocápsula revestida com polissorbato
NCCZP-CS	Nanocápsula revestida com quitosana
NCCZP-PEG	Nanocápsula revestida com polietilenoglicol
NCs	Nanocápsula
NLME	Modelagem não linear de efeitos mistos
nm	Nanomêtro
NorCZP	Norclozapina
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
P80	Polissorbato 80
PANSS	Escala de Síndrome Positiva e Negativa
PD	Farmacodinâmica
PEG	Polietilenoglicol
PK	Farmacocinética
PK/PD	Farmacocinética/farmacodinâmica
popPK	Modelagem Populacional
Q	<i>Clearance</i> intercompartimental
QLNC-QTP	Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo quetiapina

Q_{NC} e Q_{2NC}	<i>Clearance</i> intercompartimental da NC
R0	Valor de linha de base
RSE%	Desvio padrão relativo
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutico
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SNC	Sistema nervoso central
t	Tempo
TDM	Monitoramento terapêutico do medicamento
TGI	Trato gastrointestinal
V_1	Volume de distribuição do compartimento central;
V_{1NC}	Volume de distribuição central da NC
V_2	Volume de distribuição do compartimento periférico;
V_{2NC}	Volume de distribuição periférico da NC
V_{3NC}	Volume de distribuição periférico da NC
ω	Variabilidade interindividual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 Esquizofrenia.....	22
3.2 Clozapina	23
3.3 Modificação de superfície de nanopartículas	25
3.4 Modelagem Farmacocinética	27
3.5 Modelagem farmacocinética populacional.....	29
3.6 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional de fármacos nanoencapsulados	31
3.7 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional de antipsicóticos	33
Capítulo I.	36
1. INTRODUÇÃO	39
2. MÉTODOS	41
2.1 Fonte dos dados experimentais	41
2.2 Modelagem farmacocinética populacional clozapina livre.....	41
2.3 Modelagem farmacocinética populacional de nanocápsulas contendo clozapina.....	42
2.4 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional	45
3. RESULTADOS	46
3.1 Modelagem farmacocinética populacional da clozapina livre	46
3.2 Modelagem farmacocinética populacional de nanocápsulas contendo clozapina.....	48

3.3 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional (PopPK/PD)	55
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÃO.....	65
6. REFERÊNCIAS	66
4. DISCUSSÃO GERAL.....	72
5. CONCLUSÃO GERAL	75
6. REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença mental grave que retrata psicose crônica, onde fatores genéticos e ambientais podem estar associados a propensão no desenvolvimento (Miyamoto *et al.*, 2014; Cooper *et al.*, 2019). Estima-se que acometa de 0,5 - 1% da população mundial sendo os primeiros sinais manifestados no início da vida adulta (Trepanier *et al.*, 2016).

O tratamento da esquizofrenia é paliativo e contempla administração de medicamentos antipsicóticos associado à psicoterapia, visando a reinserção do indivíduo na comunidade, sendo o primeiro imprescindível no controle da doença, mas grande parte das vezes, os prejuízos acarretados pelo tratamento medicamentoso podem sobrepor os sintomas do transtorno (Miyamoto *et al.*, 2014).

A clozapina (CZP) é um antipsicótico atípico prescrita em casos de esquizofrenia refratária, devido a efeitos adversos graves associados ao seu uso (Wenthur e Lindsley, 2013), o que corresponde a 20-60 % dos casos (Howes *et al.*, 2017). Apresenta-se como antipsicótico de melhor eficácia clínica (Vanasse *et al.*, 2016), sendo eficaz contra sintomas positivos e negativos. Atua a partir do antagonismo de receptores serotoninérgico e dopaminérgicos (5HT_{2A} e D₂) nas vias mesolímbica e mesocortical, resultando em efeitos extrapiramidais menos pronunciados, conferindo vantagem sobre os demais antipsicóticos (Meltzer e Massey, 2011; Taly, 2013).

O uso prolongado de CZP pode causar agranulocitose, hepatotoxicidade e desenvolvimento de miocardite, sendo necessário um monitoramento terapêutico do medicamento e hematológico rigoroso para pacientes em tratamento (Olesen e Linnet, 2001; Bowskill *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2014; De Berardis *et al.*, 2018). Também é observado grande variabilidade interindividual nos níveis plasmáticos para pacientes em tratamento com a CZP (Bowskill *et al.*, 2012; Bowskill *et al.*, 2012a), possivelmente relacionado à extensa metabolização pré-sistêmica, mediada por enzimas do citocromo P450 (CYP), resultando em uma biodisponibilidade oral que pode variar de 27% a 47% (Cheng *et al.*, 1988; Choc *et al.*, 1990).

A busca por novas estratégias de liberação de fármacos, como sistemas nanoparticulados, torna-se útil para modular suas propriedades físico-químicas e

biofarmacêuticas, melhorando aspectos farmacocinéticos e, conseqüentemente, farmacodinâmicos (Cai *et al.*, 2010; Barua e Mitragotri, 2014). Nas últimas décadas, com a evolução da nanomedicina, foi possível o aprimoramento de nanopartículas carreadoras de fármaco com diversos potenciais terapêuticos (Martin-Banderas *et al.*, 2015; Lindqvist *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2016; Michels *et al.*, 2019). Um exemplo é a modificação da superfície das nanopartículas empregando diferentes revestimentos, com a finalidade de aprimorar seu desempenho biológico (Da Costa Güllich *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2016; Velasques *et al.*, 2018). Mais especificamente, a nanoencapsulação da CZP possibilita melhora da biodisponibilidade, biodistribuição e conseqüentemente ajuste de dose e vetorização para o sítio alvo (Manjunath e Venkateswarlu, 2005; Vieira *et al.*, 2016).

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo e estudando formulações de nanocápsulas poliméricas carreadoras de fármaco para o tratamento de diferentes patologias (Da Costa Güllich *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2018; Velasques *et al.*, 2018). Vieira *et al.* (2016) demonstraram melhora da biodisponibilidade e atividade antipsicótica da clozapina nanoencapsulada, quando comparada a mesma dose do fármaco na sua forma livre, utilizando ratos machos wistar, enquanto Sanches Moraes *et al.* (2016) e Da Costa Güllich *et al.* (2015) observaram redução de danos tóxicos causados pelo fármaco, em modelo alternativo e ratos machos wistar, respectivamente, sugerindo que a implementação dessa tecnologia possa ser promissora no tratamento da esquizofrenia.

A Modelagem e Simulação Computacional tem se mostrado uma ótima estratégia na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos para a indústria farmacêutica, pois possibilita prever os resultados dos ensaios clínicos e adaptá-los quando já estiverem em andamento, acelerando a descoberta e reduzindo custos nas etapas pré clínicas e/ou clínicas (Chaikin *et al.*, 2000; Sheiner e Steimer, 2000)

Na Modelagem Populacional (popPK) é possível identificar e avaliar diferentes fontes de variabilidade e a forma com que interferem nas concentrações plasmáticas/teciduals. Diferentemente do método clássico, análise não compartimental (ANC), a popPK permite trabalhar com dados esparsos e escassos e condições reais de uma população heterogênea (Shargel *et al.*; Ette e Williams, 2007; Bonate, 2011). Estes modelos se baseiam na modelagem não linear de efeitos mistos (NLME) e empregam estimativa bayesiana para as predições individuais, em

que se utiliza medições repetidas de um grupo de sujeitos que estão relacionadas de forma não linear com a variável resposta e variável preditora (Ette e Williams, 2007; Bonate, 2011), permitindo estimar simultaneamente os valores dos parâmetros relacionados a cada indivíduo e à população (Mian *et al.*, 2019).

Já modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) integra os modelos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, fornecendo melhor compreensão da relação dose-exposição-resposta (Chaikin *et al.*, 2000). Este tipo de abordagem *in silico* permite prever o comportamento *in vivo*. Pode ser feita de forma sequencial (Barbot *et al.*, 2003) ou simultânea (Sheiner *et al.*, 1979). Empregar estas técnicas a nanocarreadores, possibilita compreender a forma com que esses medicamentos são transportados e depositados no plasma e diferentes tecidos e o modo que contribuem na modulação da resposta (Lindqvist *et al.*, 2016; Carreño, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi descrever a relação dose-exposição-resposta de ratos machos Wistar tratados com clozapina nanoencapsulada com diferentes revestimentos comparando a mesma dose do fármaco livre em solução, empregando uma abordagem popPK/PD sequencial, considerando dados plasmáticos e de eficácia farmacológica publicados anteriormente (Vieira *et al.*, 2016).

2.2 Objetivos específicos

Determinar uma constante de liberação do fármaco no plasma para cada grupo de animais tratados com clozapina nanoencapsulada, considerando dados de liberação *in vitro*.

Descrever um modelo farmacocinético populacional, utilizando dados plasmáticos, obtidos do estudo farmacocinético, de animais tratados com clozapina livre e para cada grupo tratado com clozapina nanoencapsulada.

Descrever a relação PK/PD, considerando dados de eficácia farmacológica, obtidos do teste de pseudo-psicose induzido por anfetamina, de animais tratados com clozapina livre e nanoencapsulada com diferentes revestimentos, empregando modelagem popPK/PD sequencial.

A presente dissertação encontra-se organizada na forma de um capítulo que corresponde a um artigo científico o qual está sendo preparado para submissão.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia e os chamados transtornos esquizofrênicos contemplam um conjunto de doenças mentais graves, sem sintomas específicos, mas característicos, tais como alucinações, delírios, transtornos de pensamento e fala, perturbação das emoções e do comportamento afetivo, déficits cognitivos e avolição, podendo acarretar prejuízo no desenvolvimento social desses indivíduos (Cooper *et al.*, 2019).

Estima-se que a esquizofrenia acometa de 0,5 - 1% da população mundial e os primeiros sinais podem ser manifestados entre os 18 e 25 anos (Trepanier *et al.*, 2016). Apesar do curso variável, o diagnóstico definitivo da esquizofrenia é clínico e obedece a uma hierarquia de sintomas que são descritos no sistema de Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10). A ausência de sintomas patognomônicos, manifestação precoce e seu curso crônico, torna a esquizofrenia um transtorno que acarreta no prejuízo do desenvolvimento social desses indivíduos e suas famílias (Patel *et al.*, 2014).

O tratamento é paliativo e contempla administração de medicamentos antipsicóticos associada à terapia comportamental e abordagens psicossociais de reinserção do indivíduo à comunidade, sendo o primeiro imprescindível no controle da doença, mas grande parte das vezes, os prejuízos decorrentes do tratamento medicamentoso podem sobrepor os sintomas do transtorno (Miyamoto *et al.*, 2014; Cooper *et al.*, 2019). Adicionalmente, estudos demonstram que entre 20 e 60 % dos pacientes não respondem ou não têm adesão adequada à farmacoterapia com antipsicóticos típicos, sendo necessário a inserção de antipsicóticos atípicos, como a clozapina (CPZ) (De Berardis *et al.*, 2018).

A gravidade dos sintomas neuropsiquiátricos pode ser avaliada pela pontuação total na Escala de Síndrome Positiva e Negativa (PANSS) (Higuchi *et al.*, 2014). Um estudo controlado randomizado, realizado por Bigos *et al.* (2010) que investigou a adesão à terapia antipsicótica em pacientes esquizofrênicos, demonstrou que 74% dos pacientes interromperam a farmacoterapia antes de 18

meses devido à falta de eficácia e/ou efeitos colaterais pronunciados. Este resultado pode ser atribuído à alta variabilidade farmacocinética observada em pacientes tratados com diferentes antipsicóticos, acarretando à ineficácia farmacológica, incluindo um aumento de efeitos adversos (Bigos *et al.*, 2010).

3.2 Clozapina

O desenvolvimento da clorpromazina, na década de 1950, revolucionou o tratamento da esquizofrenia (Kane e Correll, 2010). Desde então, outros antipsicóticos com estruturas químicas diferentes e efeitos farmacológicos semelhantes foram descobertos. Mais tarde, em 1961, foi aprovada a inserção da CZP (Figura 1) no tratamento da esquizofrenia. Alguns anos depois, Claghorn *et al.* (1987) sugeriu melhor adesão e superioridade farmacológica no tratamento com CZP, quando comparada a outros antipsicóticos comumente prescritos, em especial, à clorpromazina, com redução dos efeitos extrapiramidais e melhora na resposta clínica (Claghorn *et al.*, 1987).

Em seguida, Kane *et al.* (1988) demonstraram a eficácia da CZP frente a outros antipsicóticos em casos de esquizofrenia refratária. Diversos estudos foram dedicados a casos de resistência ao manejo e tratamento da doença, corroborando com as diretrizes e protocolos clínicos de tratamento em todo o mundo (Kane *et al.*, 1988; Kane e Correll, 2010).

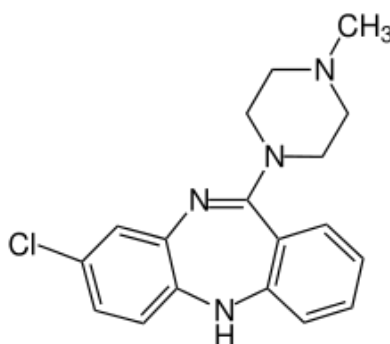


Figura 1. Estrutura química da clozapina. Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010

A CZP é classificada como um antipsicótico atípico. Estruturalmente, trata-se de uma benzodiazepina tricíclica de baixo peso molecular (326,13g/mol). Embora tenha boa resposta terapêutica, bem como tolerabilidade, seu uso ainda é bastante limitado, sendo prescrita apenas para casos de esquizofrenia refratária, devido a efeitos adversos graves associados ao seu uso (Wenthur e Lindsley, 2013). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), a CZP possui boa absorção e baixa solubilidade, se enquadrando como fármaco de Classe II. Por sofrer um extenso e variável metabolismo pré-sistêmico sua biodisponibilidade oral pode variar de 27% a 47% (Cheng *et al.*, 1988; Choc *et al.*, 1990). É eliminado principalmente pelo metabolismo hepático, mediado por enzimas do citocromo P450 (CYP). A CYP1A2 e, em menor grau CYP3A4, 2C9, 2C19 e CYP2D6, são responsáveis por catalisar a desmetilação da CZP, formando o metabolito ativo N-desmetilclozapina, (norclozapina), enquanto que a CYP3A4 (majoritariamente), CYP3A4 e flavina contendo monooxigenase (FMO3) são responsáveis formação de N-óxido de clozapina (Linnet e Olesen, 1997; Olesen e Linnet, 2001).

É importante ressaltar que a clozapina apresenta-se como o antipsicótico de melhor eficácia clínica (Vanasse *et al.*, 2016), sendo eficaz contra sintomas positivos e negativos (Breier *et al.*, 1994). Entretanto, seu uso torna-se restrito a casos de esquizofrenia refratária, o que corresponde a 20-60 % dos casos (Howes *et al.*, 2017). Seu mecanismo de ação consiste no antagonismo de receptores serotoninérgico e dopaminérgicos (5HT_{2A} e D₂), no sistema mesolímbico e mesocortical, resultando em efeitos extrapiramidais menos pronunciados, fato este que confere vantagem sobre os demais antipsicóticos comumente empregados na farmacoterapia convencional (Meltzer e Massey, 2011; Taly, 2013). Porém, o uso prolongado de CZP pode causar agranulocitose, hepatotoxicidade e desenvolvimento de miocardite, sendo necessário um monitoramento terapêutico do medicamento (TDM) e hematológico rigoroso para pacientes que fazem o uso contínuo de CZP (Olesen e Linnet, 2001; Bowskill *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2014; De Berardis *et al.*, 2018).

Além disso, é observada grande variabilidade interindividual nos níveis plasmáticos para pacientes em tratamento com CZP, sendo assim, o TDM, juntamente com a experiência clínica do prescritor, pode ser útil para estipular o regime posológico mais adequado para o paciente, (Bowskill *et al.*, 2012; Bowskill *et*

al., 2012a). Alguns estudos demonstram o gênero como sendo um dos fatores intrínsecos responsáveis pela diferença observada à exposição ao medicamento (Li *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2014), o que pode estar relacionado às concentrações diferentes de etinilestradiol entre mulheres e homens, levando à inibição da atividade da enzima CYP3A4 e 2C19 e, conseqüentemente, aumentando a concentração da CZP em pacientes do sexo feminino (Zhang *et al.*, 2007). Hábitos como tabagismo e consumo de café também podem estar relacionados às variações nas concentrações observadas nos pacientes, devido aos processos de inibição e indução da isoenzima CYP1A2. A cafeína parece inibir CYP1A2, reduzindo o *clearance* da CZP (Hägg *et al.*, 2000; Raaska *et al.*, 2004) enquanto que a fumaça do cigarro induz CYP1A2, diminuindo a exposição ao fármaco (Ng *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2011).

3.3 Modificação de superfície de nanopartículas

A nanotecnologia permite melhora das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de fármacos. Sistemas nanoparticulados apresentam diâmetro que varia de 1 a 1000 nm e tendem a ser mais estáveis e seletivos, proporcionando otimização da segurança e eficácia. As nanocápsulas (NCs) apresentam um núcleo oleoso, recoberto por invólucro polimérico, em que o princípio ativo pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede. A utilização destes sistemas tem o potencial de facilitar a passagem de fármacos por diversas barreiras, como a barreira hematoencefálica (BHE), melhorar parâmetros farmacocinéticos (PK) e aumentar especificidade por determinados tecidos, reduzindo a quantidade de fármaco em lugares não desejados (Barua e Mitragotri, 2014).

NC administradas intravascularmente devem atender alguns requisitos mínimos, como a habilidade de permanecer por mais tempo na corrente sanguínea, sem que estas partículas sejam captadas e depuradas pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) e garantir que a quantidade de fármaco presente numa dose seja capaz de ser internalizada pelas células alvo (Duan e Li, 2013). Estes requisitos podem ser modulados a partir de modificações nas características físico-químicas, como tamanho e formato das partículas e propriedades de superfície das NCs (Cai *et al.*, 2010; Duan e Li, 2013).

O tamanho de partícula tem papel fundamental na habilidade de uma nanopartícula sofrer endocitose, ou não. Basicamente, o endotélio dos vasos pode ser classificado conforme a disposição das células endoteliais e são divididos em 3 tipos: contínuo, fenestrado ou descontínuo. Endotélio do tipo contínuo, como o próprio nome sugere, apresenta uma disposição bastante coesa das células endoteliais, permitindo a difusão de moléculas pequenas, como o oxigênio. Está presente nas artérias, veias e capilares de tecidos como cérebro, pulmão, coração, pele e músculos (Félétou, 2011; Barua e Mitragotri, 2014). Estruturalmente, apresenta-se com células bastante coesas, formando uma camada lipídica continuada, repletas de mitocôndrias e proteínas de transporte e efluxo, dificultando a passagem de substâncias polares e ionizadas (Baluska *et al.*, 2006). O endotélio fenestrado, encontrado no trato gastrointestinal (TGI), glândulas endócrinas e exócrinas, glomérulos e túbulos renais, por sua vez, possui uma estrutura celular pouco menos justaposta, apresentando um tamanho de poro que varia de 50 a 60 nm. Por fim, o endotélio do tipo descontínuo, localizado nos tecidos como fígado e baço, apresenta-se de forma mal estruturada, com diâmetro de poro entre 100 e 200 nm, permitindo a passagem de partículas maiores (Félétou, 2011; Barua e Mitragotri, 2014)

Adicionalmente, modular as propriedades de superfície de um transportador nanoparticulado determina o reconhecimento pelo sistema fagocitário, afinidade com tecido linfóide e não linfóide e, conseqüentemente, a extensão da captação (Cai *et al.*, 2010; Barua e Mitragotri, 2014). A relação entre propriedades de superfície hidrofóbicas e hidrofílicas, bem como a carga superficial, têm impacto direto sobre a farmacocinética e farmacodinâmica destes nanossistemas (Yellepeddi *et al.*, 2009).

Nosso grupo de pesquisa vêm desenvolvendo diferentes nanossistemas que buscam melhorar aspectos biológicos. Vieira *et al.* (2016) desenvolveram diferentes nanocápsulas contendo clozapina com boas propriedades físico-químicas e resultados *in vivo* interessantes, sugerindo que revestimentos como polietilenoglicol (PEG) e quitosana (CS) possam ser promissores no desenvolvimento de novas formulações para o tratamento de esquizofrenia. Da Costa Güllich *et al.* (2015) demonstraram atividade neuroprotetora ocasionada pela clozapina nanoencapsula com material hidrofílico, como o PEG. Já Velasques *et al.* (2018) demonstraram que nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 (P80) reduziram efeitos tóxicos do

antimalárico quinina em *Caenorhabditis elegans* e proteção de compostos fotossensíveis.

3.4 Modelagem Farmacocinética

A introdução à PK data o ano de 1953, no livro “*Der Blutspiegel*” (Níveis sanguíneos), publicado pelo pediatra alemão Friedrich Hartmut Dost (Dost, 1953). Em seguida, foi publicada por Nelson (1961) a primeira revisão dos quatro pilares da PK: (A) absorção, (D) distribuição, (M) metabolismo e (E) excreção, frequentemente reconhecida pelo acrônimo ADME. Neste estudo, Nelson baseou-se nos primeiros trabalhos envolvendo a distribuição de fármacos no organismo (Teorell, 1937; 1937a) e que são, até hoje, a base para a compreensão e desenvolvimento de estudos farmacocinéticos baseados em modelos (Derendorf *et al.*, 2000; Ette e Williams, 2007; Owen e Fiedler-Kelly, 2014).

A PK teve crescimento com a descoberta da existência de um equilíbrio dinâmico que ocorre após a chegada do fármaco à circulação sistêmica, o equilíbrio farmacocinético. Este equilíbrio resulta em concentrações equivalentes do fármaco nos tecidos e nos líquidos extracelulares que os circundam e qualquer alteração na concentração plasmática reflete, proporcionalmente, na concentração dos órgãos e tecidos aos quais o fármaco teve acesso. Cabe ressaltar, que estes níveis plasmáticos estão relacionados com os efeitos esperados, possibilitando que a concentração plasmática do fármaco seja uma medida indireta da concentração do fármaco no sítio de ação, uma amostra de sangue, por exemplo (Ette e Williams, 2007; Storpirtis *et al.*, 2011).

A Modelagem e Simulação Computacional é uma área multidisciplinar, que consiste na aplicação de modelos matemáticos para descrever um determinado sistema e utiliza de técnicas de computação para simular uma condição específica, podendo, inclusive, auxiliar no delineamento de determinados estudos. Para a indústria farmacêutica, tem se mostrado uma ótima estratégia na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de candidatos a novos fármacos, pois possibilita prever os resultados dos ensaios clínicos antes de serem conduzidos e adaptá-los quando já estiverem em andamento, à medida que dados dos pacientes são obtidos,

acelerando a descoberta e reduzindo custos nas etapas pré clínicas e/ou clínicas (Chaikin *et al.*, 2000; Sheiner e Steimer, 2000).

Basicamente, o processo de modelagem e simulação é descrito em três partes: (1) Descrever, de forma racional, o sistema em estudo; (2) Ajustar o modelo, considerando os eventos observados; (3) Usar o modelo para prever efeitos produzidos por alterações no sistema.

Cabe ressaltar, ainda, que estes modelos são construídos para representar, de forma simples, um sistema complexo real, como o organismo e à medida que novos dados são obtidos, é possível incorporar ao modelo atual, realizando novos ajustes, quando necessário. Sendo assim, não há um modelo “certo” ou “errado”, mas sim, um modelo aperfeiçoado e ajustado para um conjunto de dados disponíveis naquele momento (Ette e Williams, 2007; Storpirtis *et al.*, 2011).

Os modelos compartimentais são os modelos matemáticos mais utilizados para descrever o curso temporal da concentração plasmática de medicamentos. Nestes modelos, o sistema biológico é simplificado para um sistema de “tanques” que se comunicam entre si através de fluídos e transportam substâncias pelo organismo, como os fármacos. Estes sistemas são descritos com uma série de equações diferenciais, que seguem a lei do equilíbrio de massas e, portanto, demonstram a entrada e saída de medicamentos de um compartimento central, para outros compartimentos periféricos, quando existentes. Cabe ressaltar que um compartimento não é um local específico, mas sim, um conjunto de órgãos e tecidos com estrutura e fluxo sanguíneo semelhantes. Cada um dos processos farmacocinéticos apresentam dois componentes essenciais à modelagem: um cinético (expresso como uma constante k) e outro relacionado à extensão ou quantidade do fármaco envolvido no processo (Shargel *et al.*; Ette e Williams, 2007).

Os modelos farmacocinéticos são bastante versáteis, pois possibilitam modificações na “estrutura básica”, permitindo adição de outros compartimentos ao modelo, a fim de representar regiões em que o fármaco tem acesso (Torres *et al.*, 2017; Zimmermann *et al.*, 2019), bem como avaliar alterações dos parâmetros farmacocinéticos em populações específicas (Mian *et al.*, 2019) ou determinar variáveis que possam afetar o perfil plasmático (covariáveis) (Olmos *et al.*, 2019).

Atualmente, já estão disponíveis alguns softwares destinados à modelagem e simulação para medicamentos em sistemas biológicos, como NONMEM® (Nonlinear Mixed Effects Modelling), Monolix® – Lixoft, Phoenix® NLME™ e PKBUGS e SAS® (Bonate, 2011; Owen e Fiedler-Kelly, 2014)

3.5 Modelagem farmacocinética populacional

A Modelagem Populacional (popPK) é uma poderosa ferramenta no âmbito da farmacometria, que permite identificar e avaliar diferentes fontes de variabilidade (demográficas, fisiológicas, patológicas e tecnológicas) e a forma com que afetam, ou não, as concentrações plasmáticas/teciduals. Nos métodos tradicionais, como a análise não compartimental (ANC), frequentemente a área sob a curva de concentração-tempo do medicamento no plasma (AUC) é utilizada para avaliar a exposição a um determinado fármaco e, apesar de fornecer resultados concisos, é necessário um grande número de amostragens para fornecer valores com baixo erro. Quando comparada à ANC, a popPK demonstra superioridade, já que permite trabalhar com dados esparsos e escassos e condições reais de uma população heterogênea submetidos ao mesmo regime posológico, considerando e avaliando a variabilidade inter e intraindividual entre estes sujeitos empregando a equação 1 (Shargel *et al.*; Ette e Williams, 2007; Bonate, 2011).

$$\theta_i = \theta_{pop} * e^{\eta_i} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde θ_i é o parâmetro estimado para o *iésimo* sujeito, θ_{pop} representa o valor típico do parâmetro farmacocinético estimado para a população, e η_i é a diferença θ_i e θ_{pop} , em escala logarítmica.

Os modelos popPK são baseados na modelagem não linear de efeitos mistos (NLME) e empregam estimativas, como a bayesiana, para as predições individuais. São utilizadas quando se tem medições repetidas de um grupo de sujeitos (dados

longitudinais) e estas estão relacionadas de forma não linear com a variável resposta e variável preditora (Ette e Williams, 2007; Bonate, 2011).

A NLME permite estimar simultaneamente os valores dos parâmetros relacionados a cada indivíduo e à população e fazer deduções sobre a variabilidade não explicada observadas no perfil da população (Mian *et al.*, 2019). Envolve efeitos fixos (parâmetros relacionados à população) e aleatórios (associados à variabilidade inter e intra-individual). Sendo assim, é de grande interesse na área da farmacologia, pois permite avaliar a relação não linear entre um conjunto de variáveis dependentes (concentração plasmática) e independentes (dose, tempo e aspectos demográficos, por exemplo). É importante ressaltar que valores populacionais médios e sua variabilidade dentro da população compõe o conjunto de característica de uma determinada população.

Li *et al.* (2014) desenvolveram um modelo popPK (NONMEN®) que descreve a concentração de CZP e seu metabólito ativo norclozapina (norCZP) no plasma e cérebro de ratos, após uma administração de 10 mg/kg, por via subcutânea, e predisseram suas concentrações e nível de ocupação no receptores do cérebro humano, utilizando uma abordagem translacional. Amostras de sangue (plasma) e líquido extravascular cerebral (microdiálise), coletados simultaneamente em tempos pré determinados, foram utilizados como dados de entrada para a construção do modelo. Um modelo de dois compartimentos, representado por um compartimento central (para concentrações plasmáticas) e um compartimento periférico (para concentrações cerebrais), com absorção de primeira ordem, descreveu a farmacocinética da CZP e norCZP em ratos. Um atraso aparente na distribuição da CZP foi identificado entre o plasma e o cérebro e incorporado ao modelo final. Os parâmetros populacionais do Cl , V_1 , Q e constante de absorção (K_a) foram estimados como 0.5 L/min, 14.4 L, 2.01 L/min e 0.008 min^{-1} , respectivamente, utilizando a equação 1. para avaliar a variabilidade entre os animais (BAV). O estudo também previu a exposições da CZP e seu metabólito no sistema nervoso central de humanos, a partir os parâmetros popPK estimados anteriormente para ratos, utilizando uma abordagem translacional rato-humano. O estudo demonstrou que, em conjunto, estas abordagens são ferramentas interessantes a serem implementadas em etapas pré-clínicas de estudo de medicamentos (Li *et al.*, 2014).

Já Li *et al.* (2012) avaliaram o efeito do peso, idade, sexo e tabagismo como covariáveis para explicar a variabilidade observada no perfil farmacocinético da CZP e norCZP de paciente chineses com esquizofrenia, utilizando uma abordagem popPK (NONMEN®). Um modelo de um compartimento com absorção de primeira ordem descreveu o comportamento da CZP e norCZP. Peso e idade, não influenciaram significativamente os parâmetros farmacocinéticos. Em contrapartida, sexo e tabagismo apresentaram-se como covariáveis para alterações no perfil plasmático de CZP e norCZP, sendo a depuração maior em indivíduos do sexo masculino ($\pm 20\%$) e fumantes ($\pm 45\%$). O estudo concluiu que o regime posológico de pacientes chineses pode precisar ser ajustado com base no sexo e o hábito do fumo (Li *et al.*, 2012). Similarmente, outro estudo realizado por Olmos *et al.* (2019) avaliou o efeito do tabagismo, idade, sexo, consumo de cafeína, diferentes marcas de CZP e comedicação em pacientes uruguaios com esquizofrenia, utilizando uma abordagem popPK (NONMEN®). O estudo demonstrou que apenas o tabagismo causou um aumento significativo na depuração aparente da CZP ($\pm 32\%$) (Olmos *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que a maioria dos estudos popPK sobre CZP tem como principal objetivo avaliar as concentrações de CZP diante de uma covariável (Li *et al.*, 2012; Olmos *et al.*, 2019). Entretanto, o controle dos sintomas positivos e negativos que acompanham os transtornos esquizofrênicos não depende estritamente da concentração plasmática do fármaco, mas também do tempo de exposição ao tratamento.

3.6 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional de fármacos nanoencapsulados

A modelagem PK/PD é uma abordagem inovadora em que integra os modelos farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD), fornecendo melhor compreensão da relação dose-exposição-resposta, podendo ser utilizada na tomada de decisões importantes como o delineamento do regime posológico (Chaikin *et al.*, 2000). Em outras palavras, a utilização deste tipo de abordagem *in silico* permite prever o comportamento *in vivo*. Pode ser feita de forma sequencial (Barbot *et al.*, 2003) ou simultânea (Sheiner *et al.*, 1979). Os modelos sequenciais são construídos a partir de uma análise PK em que, primeiramente, estima-se os

parâmetros farmacocinéticos e, sequencialmente, estes serão fixados, condicionando os parâmetros PD e, conseqüentemente, a modelagem PK/PD. Já na Modelagem PK/PD simultânea, os parâmetros PK e PD se ajustam uma única vez, sendo distribuídos em conjunto no PK/PD. Ambas abordagens podem fornecer resultados parecidos, porém muitos estudos optam pelo uso de modelagem PK/PD sequencial, pois medições PD são, geralmente, menos precisas quando comparadas às PK (Zhang *et al.*, 2003; Ette e Williams, 2007). Quando aplicada a nanossistemas, a modelagem PK/PD permite compreender o mecanismo de como esses medicamentos são transportados e depositados no plasma e diferentes tecidos, bem como a forma que atuam na modulação da resposta.

Assim como na popPK, a equação 1 também pode ser empregada em um modelo popPK/PD para avaliar a variabilidade interindividual entre os parâmetros PD dos indivíduos que compõem o grupo. Os modelos de efeito máximo (E_{max}) e E_{max} sigmoidal (eq 2 e 3) são os modelos mais utilizados para descrever a relação não linear observada da concentração plasmática *versus* efeito. O modelo E_{max} descreve a relação hiperbólica da concentração plasmática *versus* efeito, enquanto o fator de Hill, incorporado ao modelo de E_{max} sigmoidal, modifica a inclinação da curva, passando-a para um formato sigmoidal.

$$E = \frac{E_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad (\text{eq 2.})$$

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^N}{EC_{50} + C^N} \quad (\text{eq 3.})$$

onde E é o efeito; E_{max} é o efeito máximo observado; C é a concentração plasmática do fármaco; EC_{50} concentração plasmática do fármaco que equivale a 50% do efeito máximo; e N constante que descreve a sigmoicidade da relação concentração-efeito (fator de Hill).

Carreño (2019) desenvolveu um modelo popPK/PD (NONMEN®) que descreve alterações da farmacocinética plasmática e distribuição cerebral de um análogo estrutural da CZP, a quetiapina, carregada em nanocápsulas poliméricas de

núcleo lipídico com o fármaco (QLNC-QTP), em ratos machos e fêmeas hígdos e com esquizofrenia neurodesenvolvimental (indução à prole), após a administração do fármaco livre ou QLNC-QTP. Dentre os resultados, foi possível observar que uma pequena fração do fármaco é liberado rapidamente *in vivo*, no plasma, pois trata-se da fração adsorvida às paredes poliméricas, enquanto que o fármaco que está, de fato, disperso no núcleo lipídico da nanocápsula irá se liberar de forma diferente que no plasma e este tem a capacidade de penetrar e liberar o fármaco nos diferentes tecidos, incluindo o cérebro. Além disso, também foi demonstrado um aumento de aproximadamente de três vezes no valor de EC_{50} para o fármaco livre, nos animais com esquizofrenia experimental em comparação com animais hígdos, enquanto que QLNC-QTP demonstrou alterações no parâmetro entre os modelos experimentais. Em conjunto, a abordagem se demonstrou útil na compreensão do *delivery* cerebral de fármacos, bem como limitações da utilização de QLNC-QTP no tratamento da esquizofrenia.

3.7 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional de antipsicóticos

Considerando que modelagem PK/PD descreve a relação temporal entre os perfis PK e PD fornecendo uma avaliação desde o início até a duração do efeito, uma vez que a supressão dos sintomas e a adesão à farmacoterapia são importantes para o não abandono e efetividade do tratamento, este tipo de abordagem torna-se bastante útil nas etapas pré-clínicas e clínicas do desenvolvimento bem otimização do regime terapêutico dessa classe de medicamentos. Apesar da boa eficácia clínica da CZP, a alta variabilidade interindividual na expressão das enzimas que compõe a CYP, e que são responsáveis pela metabolização, em especial CYP1A2, pode levar à alterações importantes na concentração plasmática levando à níveis inadequados do fármaco (Olesen e Linnet, 2001; Van Troostwijk *et al.*, 2003; Raedler *et al.*, 2008). Nestes casos, a utilização de abordagem populacional torna-se bastante interessante, pois como já mencionado, permite trabalhar com dados esparsos e identificar variabilidades.

Parker *et al.* (2001), a partir de uma abordagem popPK/PD hierárquica (NONMEN®), utilizaram a CZP como controle positivo na etapa pré-clínica de desenvolvimento de dois novos antipsicóticos, após a administração por infusão intravenosa dos fármacos, em roedores. Dados de concentrações plasmáticas (PK) e medidas de eletroencefalografia (PD) foram empregados como valores de entrada para as estimativas. Um modelo de dois compartimentos descreveu adequadamente o comportamento plasmático da CZP. Os parâmetros popPK/PD foram estimados utilizando um modelo de E_{max} sigmoidal com compartimentos de efeito (Eq. 4):

$$E = E_0 + \sum_{i=1}^2 \frac{E_{max,i} \cdot C^N i}{EC_{50,i} + C^N i} \quad (\text{eq 4.})$$

Em que E é o efeito; E_0 é definido como o valor de linha de base da eletroencefalografia; E_{max} o efeito máximo; EC_{50} a concentração plasmática do fármaco que equivale a 50% do efeito máximo; e N a constante que descreve a sigmoicidade da relação concentração-efeito.

Já Olsen *et al.* (2008) avaliaram a eficiência com que a modelagem PK/PD (WinNonlin® - Pharsight Corporation, Mountain View, CA, EUA) se aplica a antipsicóticos, correlacionando previsões de PK/PD de níveis plasmáticos com o nível de ocupação dos receptores dopaminérgicos (D_2) necessário para suprimir a esQUIVA condicionada de ratos machos Wistar tratados com haloperidol, sertindol, CZP, risperidona e olanzapina. Um modelo de um compartimento com processo de eliminação linear descreveu a PK, enquanto que a relação PK/PD foi descrita como um modelo E_{max} sigmoidal com compartimento de efeito. Os valores obtidos para a EC_{50} do ensaio de ocupação dos receptores D_2 e da resposta de esQUIVA condicionada foram comparados entre si e com valores reportados de pacientes esQUIZOFRÊNICOS em tratamento com antipsicóticos. Os autores observaram que uma concentração plasmática do fármaco no estado de equilíbrio (C_{ss}) de 0.254 $\mu\text{g/mL}$ leva a 25 % da ocupação dos receptores D_2 , o que equivale a 50 % da resposta de esQUIVA condicionada, em ratos. O estudo demonstrou boa correlação dos níveis plasmáticos eficazes na supressão da resposta de esQUIVA condicionada para o haloperidol, CZP e risperidona, sugerindo que o modelo proposto é útil para

determinar valores de concentrações plasmáticas efetivas para candidatos a novos antipsicóticos (Olsen *et al.*, 2008).

Além disso a popPK/PD é uma ferramenta interessante para entender o efeito retardado da CZP e outros psicotrópicos, já que a melhora clínica dos sintomas associados à esquizofrenia pode ser observada algumas semanas após o início do tratamento. Shang *et al.* (2014) predisseram a eficácia clínica de diferentes regimes posológicos de CZP, a partir de uma abordagem popPK/PD (NONMEN®), utilizando amostras de sangue obtidas de pacientes com esquizofrenia como dados de entrada PK e escore do PANSS para avaliação PD. Os pacientes que compuseram o estudo representavam um grupo heterogêneo, composto por mulheres não fumantes e homens fumantes e não fumantes, de diferentes idades que receberam doses diárias de 50, 200 e 400 mg de CZP, por via oral, por 84 dias. Um modelo PK de dois compartimentos, com eliminação linear foi utilizado para explicar o perfil plasmático da CZP. As covariáveis identificadas foram sexo e tabagismo, sendo que a depuração da CZP foi maior em pacientes homens e fumantes. Já o modelo popPK/PD foi descrito como E_{max} sigmoidal sem influência de covariáveis. No primeiro cenário, a dose diária mínima não atingiu o efeito máximo dentro de 84 dias e a dose mais alta não demonstrou ser mais eficaz do que a dose intermediária em todos os grupos, sendo que haveriam efeitos clínicos significativos para os regimes de 200 e 400 mg, após 42 dias. Além disso, as simulações também sugeriram que os regimes de dose acelerada e dose constante atingiriam o mesmo efeito clínico após 42 dias, sendo o primeiro mais interessante para pacientes sensíveis aos efeitos colaterais. O estudo demonstrou que a utilização PK/PD é útil para seleção de regimes posológicos individuais (Shang *et al.*, 2014).

CAPÍTULO I.

(o artigo será submetido na revista *British Journal of Clinical Pharmacology*, após a tradução para o inglês)

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA POPULACIONAL DE CLOZAPINA NANOENCAPSULADA EM RATOS WISTAR

RESUMO: A clozapina (CZP) é um antipsicótico atípico prescrita em casos de esquizofrenia refratária devido a efeitos adversos graves associados ao seu uso. Também é observada uma farmacocinética variável, ocasionada pela extensa metabolização pré sistêmica, acarretando numa biodisponibilidade que varia de 27 a 47 %. A nanotecnologia vem como uma estratégia promissora para *delivery*, a fim de melhorar a exposição cerebral de fármacos que atuam no sistema nervoso central. O objetivo do presente estudo foi descrever a relação dose-exposição-resposta de ratos machos Wistar tratados com solução de CZP livre ou nanoencapsulada com polissorbato 80 (NCCZP), polietilenoglicol (NCCZP-PEG) ou quitosana (NCCZP-CS), empregando uma abordagem popPK/PD sequencial. Os dados foram coletados de um estudo prévio realizado por (Vieira *et al.*, 2016). O software Monolix® – Lixoft foi utilizado para modelagem dos dados. Primeiro foi realizado a modelagem farmacocinética populacional (popPK) do grupo free CZP e novos compartimentos foram incorporados, a fim de representar a distribuição de NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS. Os dados popPK foram fixados e o parâmetros farmacodinâmicos (PD) foram estimados. Um modelo de dois compartimentos, associado ao modelo proposto para CZP livre descreveu adequadamente o comportamento para NCCZP e NCCZP-PEG. Enquanto NCCZP-CS foi melhor descrita por um modelo de três compartimentos, associado ao modelo proposto para CZP livre. Os resultados demonstraram que a nanoencapsulação aumentou a distribuição para todos os grupos, sendo maior para NCCZP-PEG. A partir na popPK/PD sequencial, foi observado redução na quantidade de fármaco necessário para obter 50% da resposta máxima (IC_{50}) para todos os grupos e um retorno mais lento ao nível basal, especialmente para NCCZP-CS. Em conjunto NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS demonstraram ser mais potentes e terapeuticamente promissores na terapia farmacológica para pacientes com esquizofrenia.

Palavras-chave: esquizofrenia; clozapina; nanocápsula; modelagem populacional; modelo popPK; modelo popPK

POPULATION PHARMACOKINETIC/PHARMACODYNAMIC MODELING OF NANOENCAPSULATED CLOZAPINE IN WISTAR RATS

ABSTRACT: Clozapine (CZP) is an atypical antipsychotic prescribed in cases of refractory schizophrenia due to serious adverse effects associated with its use. Variable pharmacokinetics are also observed, caused by extensive pre-systemic metabolism, resulting in bioavailability ranging from 27 to 47%. Nanotechnology comes as a promising delivery strategy in order to improve brain exposure to drugs that act on the central nervous system. The aim of the present study was to describe the dose-exposure-response relationship of male Wistar rats treated with free or nanoencapsulated CZP solution with polysorbate 80 (NCCZP), polyethylene glycol (NCCZP-PEG) or chitosan (NCCZP-CS), using an approach sequential popPK / PD. Data were collected from a previous study by (Vieira *et al.*, 2016). The Monolix® - Lixoft software was used for data modeling. First, population pharmacokinetic modeling (popPK) of the free CZP group was carried out and new compartments were incorporated in order to represent the distribution of NCCZP, NCCZP-PEG and NCCZP-CS. The popPK data were fixed and the pharmacodynamic parameters (PD) were estimated. A two-compartment model, associated with the proposed model for free CZP, adequately described the behavior for NCCZP and NCCZP-PEG. While NCCZP-CS was best described by a three-compartment model, associated with the model proposed for free CZP. The results showed that nanoencapsulation increased the distribution for all groups, being higher for NCCZP-PEG. From the sequential popPK/PD, a reduction in the amount of drug needed to obtain 50% of the maximum response (IC_{50}) was observed for all groups and a slower return to baseline, especially for NCCZP-CS. Together NCCZP, NCCZP-PEG and NCCZP-CS have been shown to be more potent and therapeutically promising in pharmacological therapy for patients with schizophrenia.

Key-words: schizophrenia; clozapine; nanocapsule; population modeling; popPK model; popPK / PD model

1. INTRODUÇÃO

A clozapina (CZP) é um antipsicótico atípico, prescrita em casos de esquizofrenia refratária, o que corresponde a 20-60 % dos casos (Howes *et al.*, 2017). É considerada como o antipsicótico de melhor eficácia clínica (Vanasse *et al.*, 2016), sendo eficaz contra sintomas positivos e negativos da doença (Breier *et al.*, 1994). Por sofrer um extenso e variável metabolismo pré-sistêmico estima-se que sua biodisponibilidade oral pode variar de 27% a 47% (Cheng *et al.*, 1988; Choc *et al.*, 1990). Atua a partir do antagonismo de receptores serotoninérgico (5HT_{2A}) e dopaminérgicos (D₂), no sistema mesolímbico e mesocortical, resultando em efeitos extrapiramidais menos pronunciados quando comparado a outros antipsicóticos (Meltzer e Massey, 2011; Taly, 2013).

Sua prescrição é limitada devido a efeitos adversos graves associados ao uso prolongado, tais como agranulocitose, hepatotoxicidade e desenvolvimento de miocardite (De Berardis *et al.*, 2018). Também é observada uma grande variabilidade plasmática entre os pacientes em tratamento com a CZP (Bowskill *et al.*, 2012; Bowskill *et al.*, 2012a). Alguns estudos demonstram que o gênero (Li *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2014) e hábitos de consumo regular de café (Hägg *et al.*, 2000; Raaska *et al.*, 2004) e tabaco (Ng *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2011), são fatores importantes na diferença de níveis plasmáticos da CZP em pacientes.

Sistemas nanoparticulados tendem a ser mais estáveis e seletivos, proporcionando otimização da segurança e eficácia, por meio de modificações de propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de fármacos, sendo uma ótima estratégia no *delivery* cerebral de fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC) (Barua e Mitragotri, 2014). A utilização destes sistemas tem o potencial de melhorar parâmetros farmacocinéticos, facilitar a passagem de fármacos por diversas barreiras, como a barreira hematoencefálica (BHE), e aumentar especificidade por determinados tecidos (Manjunath e Venkateswarlu, 2005; Dimer *et al.*, 2015; Carreño *et al.*, 2016a).

Nosso grupo de pesquisa vêm trabalhando com diferentes nanossistemas visando melhora de aspectos biológicos. Vieira *et al.* (2016) demonstraram melhora dos parâmetros farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD) da CZP nanoencapsulada, sugerindo que revestimentos como polietilenoglicol (PEG) e

quitosana (CS) possam ser promissores no desenvolvimento de novas formulações para o tratamento de esquizofrenia (Vieira *et al.*, 2016). Da Costa Güllich *et al.* (2015) demonstraram atividade neuroprotetora da CZP nanoencapsulada, em ratos Wistar, especialmente empregando PEG como revestimento. Já Velasques *et al.* (2018) demonstraram proteção dos compostos fotossensíveis e redução dos efeitos tóxicos do antimalárico quinina em *Caenorhabditis elegans*, em nanocápsulas revestidas com polissorbato (P80).

A modelagem Populacional (popPK) permite identificar e avaliar diferentes fontes de variabilidade e a forma com que afetam as concentrações plasmáticas/teciduais. Ao passo que a modelagem popPK/PD é uma abordagem que integra os modelos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, fornecendo melhor compreensão da relação dose-exposição-resposta, podendo ser útil no delineamento do estudo e regime posológico (Chaikin *et al.*, 2000; De Witte *et al.*, 2018). Empregar popPK/PD a sistemas nanotecnológicos, especialmente a fármacos que atuam no SNC, possibilita prever o comportamento *in vivo* que possa influenciar na modulação da resposta, compreendendo os parâmetros formulação-dependente que contribuam para *delivery* cerebral (Bouw *et al.*, 2000; Lindqvist *et al.*, 2016; Carreño, 2019).

O presente trabalho propôs um modelo matemático que descreve a farmacocinética da CZP livre e nanoencapsulada, considerando dados de liberação *in vitro*, plasmáticos e de eficácia farmacológica publicados anteriormente (Vieira *et al.*, 2016), estimou os parâmetros farmacocinéticos populacionais e correlacionou-os com o estudo farmacodinâmico, a fim de explorar os efeitos dose-exposição-resposta para diferentes sistemas nanoparticulados, utilizando uma abordagem popPK/PD sequencial.

2. MÉTODOS

2.1 Fonte dos dados experimentais

Os dados utilizados para a modelagem foram coletados de um estudo prévio realizado por Vieira *et al.* (2016). Resumidamente, o estudo de liberação *in vitro* foi realizado utilizando o método de saco de diálise, imerso em meio de liberação pH 7,4, 37°C, com agitação constante. Alíquotas do meio de liberação, contendo o fármaco dissolvido, foram retiradas em tempos pré determinados a fim de avaliar a eficiência de dissolução do fármaco. Para o estudo farmacocinético, foram utilizados ratos machos Wistar não anestesiados (270-350 g). Os animais receberam 5 mg.kg⁻¹, IV *bolus*, de CZP livre ou nanoencapsulada (nanocápsula revestida com polissorbato – NCCZP; nanocápsula revestida com polietilenoglicol – NCCZP-PEG ou nanocápsula revestida com quitosana – NCCZP-CS). Amostras de sangue foram coletadas em tempos pré-determinados e processadas para quantificar a concentração da CZP plasmática. Os dados de eficácia farmacológica utilizados para realizar a análise popPK/PD foram coletados a partir do teste de pseudo psicose induzida por anfetamina (apomorfina). Foram utilizados ratos machos Wistar não anestesiados, pesando entre 250 e 300 g. Os animais receberam 5 mg.kg⁻¹, via intraperitoneal, de CZP livre ou nanoencapsulada (NCCZP, NCCZP-PEG ou NCCZP-CS) e o percentual de movimento de cabeça foi contabilizado em tempos pré-determinados. O conjunto de dados para a análise popPK e popPK/PD foi plotado individualmente para cada grupo, contendo valores das concentrações plasmáticas de clozapina (µg.mL⁻¹) *versus* tempo (h) e o percentual do movimento de cabeça *versus* tempo (h), utilizando o programa Excel® 2016 (Microsoft) e exportado ao Monolix®2019R2 (Lixoft).

2.2 Modelagem farmacocinética populacional clozapina livre

O grupo free CZP foi o primeiro estudado, afim de estimar parâmetro médios populacionais a serem fixados na estrutura básica dos modelos popPK dos demais

grupos. Modelos de um, dois e três compartimentos e erros residuais aditivo, proporcional e combinado foram testados. Todos os modelos foram avaliados conforme o desvio padrão relativo (RSE%) dos parâmetros populacionais. Os gráficos de qualidade de ajuste “*Goodness of fit*”, análise preditiva visual (VPC), critério de informação de Akaike (AIC) e -2LL (log-likelihood) também foram observados.

Como um modelo de dois compartimentos com eliminação linear, erro residual proporcional e distribuição normal se ajustou melhor às concentrações observadas para CPZ livre, as equações diferenciais abaixo foram utilizadas na descrição do modelo final:

$$\frac{dAczp1}{dt} = -\left(\frac{Q}{V1} \cdot Aczp1\right) + \left(\frac{Q}{V2} \cdot Aczp2\right) - (k \cdot Aczp1) \quad (1)$$

$$\frac{dAczp2}{dt} = \left(\frac{Q}{V1} \cdot Aczp1\right) - \left(\frac{Q}{V2} \cdot Aczp2\right) \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = k \cdot Aczp1 \quad (3)$$

Em que: $Aczp_1$ – quantidade de fármaco no compartimento central; $Aczp_2$ – quantidade do fármaco no compartimento periférico; t – tempo; Q – *clearance* intercompartimental; V_1 – volume de distribuição do compartimento central; V_2 – volume de distribuição do compartimento periférico; K – constante de eliminação do fármaco; E – Quantidade de fármaco eliminado.

2.3 Modelagem farmacocinética populacional de nanocápsulas contendo clozapina

Para a modelagem popPK de cada grupo de nanocápsulas (NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS), utilizamos uma metodologia de modelagem sequencial. Assim,

os parâmetros farmacocinéticos populacionais obtidos do grupo CZP livre foram fixados e novos compartimentos foram incorporados ao modelo, a fim de representar a CZP nanoencapsulada a nível central e periférico. Na descrição dos modelos, os valores obtidos de taxa de encapsulação (F_{NC}) foram fixados e estabelecemos um coeficiente de liberação (k_r) para cada grupo, utilizando os resultados obtidos do teste de liberação *in vitro* (Vieira *et al.*, 2016). O K_r foi estimado com auxílio do software DDSolver®, empregando os valores de fármaco liberado (%) *versus* tempo (h). Os valores obtidos para k_r dos grupos NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS foram selecionados conforme a análise visual dos gráficos (dados observados *versus* preditos) e AIC.

As equações abaixo foram utilizadas para descrever o modelo de dois compartimentos com eliminação linear para NCCZP e NCCZP-PEG:

$$\frac{dAczp1}{dt} = (k_r \cdot Anc) - \left(\frac{Q}{V_1} \cdot Aczp1\right) + \left(\frac{Q}{V_2} \cdot Aczp2\right) + (kfpc \cdot Aczp3) - (k \cdot Aczp1) \quad (4)$$

$$\frac{dAczp2}{dt} = \left(\frac{Q}{V_1} \cdot Aczp1\right) - \left(\frac{Q}{V_2} \cdot Aczp2\right) \quad (5)$$

$$\frac{dAczp3}{dt} = (k_r \cdot A2nc) - (kfpc \cdot Aczp3) \quad (6)$$

$$\frac{dAnc}{dt} = -(k_r \cdot Anc) + \left(\frac{Q_{nc}}{V_{2nc}} \cdot A2nc\right) - \left(\frac{Q_{nc}}{V_1} \cdot Anc\right) \quad (7)$$

$$\frac{dA2nc}{dt} = -\left(\frac{Q_{nc}}{V_1} \cdot A2nc\right) + \left(\frac{Q_{nc}}{V_{2nc}} \cdot Anc\right) - (k_r \cdot A2nc) \quad (8)$$

Onde: $Aczp_1$ – quantidade de fármaco livre no compartimento central; $Aczp_2$ – quantidade de fármaco livre no compartimento periférico; $Aczp_3$ – quantidade de fármaco liberado no compartimento periférico da nanocápsula; Anc – quantidade de fármaco nanoencapsulado no compartimento central; $A2nc$ – quantidade de fármaco nanoencapsulado no compartimento periférico; t – tempo; Q – *clearance* intercompartimental do fármaco livre; V_1 – volume de distribuição do compartimento central do fármaco livre; V_2 – volume de distribuição do compartimento periférico do fármaco livre; V_{1NC} - volume de distribuição central da NC; V_{2NC} – volume de

distribuição periférico da NC; Q_{NC} *clearance* intercompartimental da NC; k – constante de eliminação; K_r – constante de liberação; K_{fpc} – constante de retorno do fármaco livre liberado no compartimento periférico para compartimento central.

Um modelo de três compartimentos com eliminação linear foi o que melhor descreveu os resultados experimentais do grupo NCCZP-CS, utilizando as equações diferenciais abaixo:

$$\frac{dAczp1}{dt} = (kr \cdot Anc) - \left(\frac{Q}{V_1} \cdot Aczp1\right) + \left(\frac{Q}{V_2} \cdot Aczp2\right) - (k \cdot Aczp1) \quad (9)$$

$$\frac{dAczp2}{dt} = \left(\frac{Q}{V_1} \cdot Aczp1\right) - \left(\frac{Q}{V_2} \cdot Aczp2\right) \quad (10)$$

$$\frac{dAnc}{dt} = -(kr \cdot Anc) + \left(\frac{Q_{nc}}{V_{2nc}} \cdot A_{2nc}\right) - \left(\frac{Q_{nc}}{V_{1nc}} \cdot Anc\right) - \left(\frac{Q_{2nc}}{V_{1nc}} \cdot Anc\right) + \left(\frac{Q_{2nc}}{V_{3nc}} \cdot A_{3nc}\right) \quad (11)$$

$$\frac{dA_{2nc}}{dt} = -\left(\frac{Q_{nc}}{V_{2nc}} \cdot A_{2nc}\right) + \left(\frac{Q_{nc}}{V_{1nc}} \cdot Anc\right) \quad (12)$$

$$\frac{dA_{3nc}}{dt} = \left(\frac{Q_{2nc}}{V_{1nc}} \cdot Anc\right) - \left(\frac{Q_{2nc}}{V_{3nc}} \cdot A_{3nc}\right) \quad (13)$$

Onde: $Aczp_1$ – quantidade de fármaco livre no compartimento central; $Aczp_2$ – quantidade de fármaco livre no compartimento periférico; $Aczp_3$ – quantidade de fármaco liberado no compartimento periférico da nanocápsula; Anc – quantidade de fármaco nanoencapsulado no compartimento central; A_{2nc} – quantidade de fármaco nanoencapsulado no compartimento periférico; A_{3nc} - quantidade de fármaco nanoencapsulado no terceiro compartimento periférico; t – tempo; Q – *clearance* intercompartimental do fármaco livre; V_1 – volume de distribuição do compartimento central do fármaco livre; V_2 – volume de distribuição do compartimento periférico do

fármaco livre; V_{1NC} - volume de distribuição central da NC; V_{2NC} - volume de distribuição periférico da NC; Q_{nc} e Q_{2nc} - *clearance* intercompartimental da NC; k - constante de eliminação; K_r - constante de liberação

2.4 Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica Populacional

Os parâmetros popPK/PD foram estimados empregando uma abordagem sequencial (De Witte *et al.*, 2018) para todos os grupos, fixando os parâmetros popPK estimados anteriormente. Os modelos de compartimento de efeitos e *turnover* foram testados para a escolha do modelo popPK/PD que melhor descrevesse as relações concentração plasmática *versus* efeito. Todos os modelos foram avaliados conforme RSE% dos parâmetros populacionais, gráficos de qualidade de ajuste, valores de AIC e de -2LL.

Para todos os grupos, um modelo de *turnover* utilizando a equação abaixo foi empregado para estimar descrever os resultados de movimento de cabeça dos grupos CZP livre, NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS:

$$\frac{dR}{t} = k_{in} \left(1 - \frac{I_{max} * C_p}{IC_{50} + C_p} \right) - k_{out} * R \quad (14)$$

Onde: $\frac{dR}{t}$ - taxa de variação da resposta biológica; k_{in} - constante de formação da resposta (ordem zero); I_{max} - inibição máxima observada pelo fármaco; C_p - concentração plasmática; IC_{50} - quantidade de fármaco necessário para obter 50% da resposta máxima; k_{out} - constante de remoção da resposta (primeira ordem); R - resposta.

3. RESULTADOS

3.1 Modelagem farmacocinética populacional da clozapina livre

Um total de 119 observações de dados plasmáticos foram obtidas de 8 indivíduos. Após a comparação dos diferentes modelos e erros, o perfil farmacocinético dos animais tratados com 5 mg.kg^{-1} , IV *bolus*, de CZP livre foi melhor descrito por um modelo de dois compartimentos com eliminação linear (figura 1. A). A variabilidade residual não explicada foi descrita como proporcional, apresentando uma distribuição normal dos dados. Além disso, variabilidade interindividual foi incluída em Cl , V_1 e V_2 . Neste modelo a dose de fármaco administrada no compartimento central, pode se distribuir a um segundo compartimento. A eliminação ocorre de forma linear, a partir do compartimento central. As estimativas finais dos parâmetros estão resumidas na Tabela 1. A Figura 2A apresenta o perfil individual e populacional modelado, dentro de um intervalo de previsão de 90 %. Todos os parâmetros no modelo foram estimados com boa precisão, conforme indicado pelos valores do desvio padrão relativo (RSE%) e os gráficos de qualidade de ajuste (Figuras 3A e 4A).

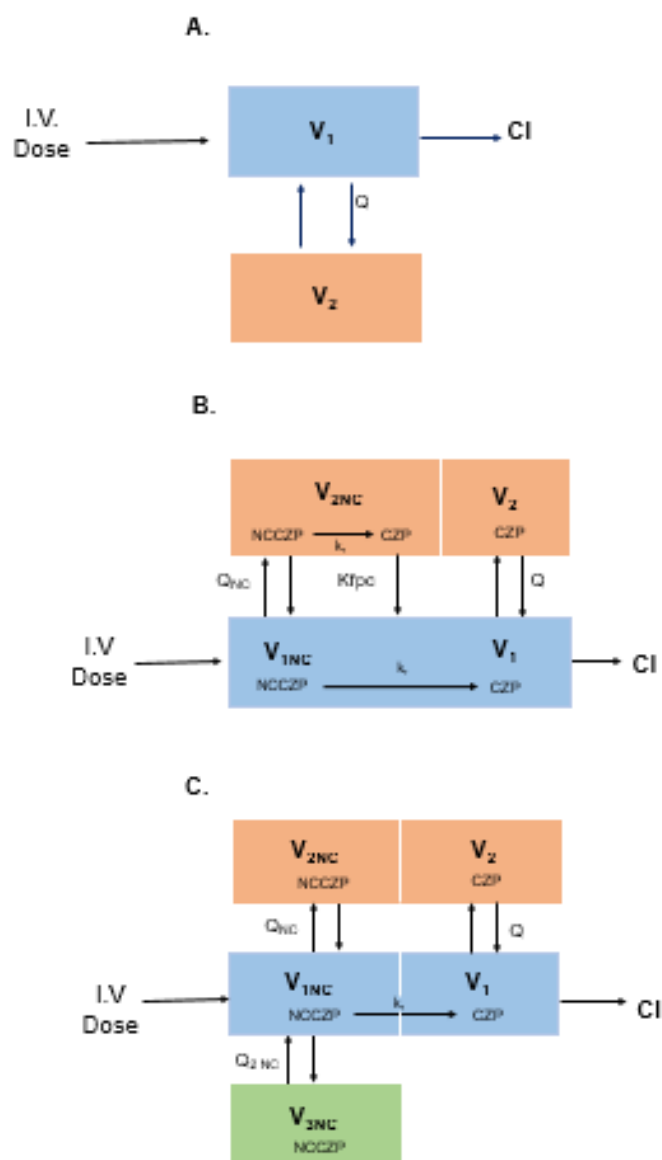


Figura 1. Representação esquemática dos modelos estruturais finais para A. CZP livre: Modelo de dois compartimentos com eliminação linear; B. NCCZP e NCCZP-PEG: Modelo de dois compartimentos associado ao modelo bicompartimental com eliminação linear da CZP livre; e C. NCCZP-CS: Modelo de três compartimentos associado ao modelo bicompartimental com eliminação linear da CZP livre. A cor laranja representa o compartimento central. As cores azuis e verdes representam o segundo e o terceiro compartimento, respectivamente. CI – clearance, para CZP livre. V_1 – volume de distribuição no compartimento central, para CZP livre. V_2 - volume de distribuição no compartimento periférico, para CZP livre. Q – Clearance intercompartimental, para CZP livre. V_{1NC} - volume de distribuição no compartimento central, para a CZP nanoencapsulada. V_{2NC} e V_{3NC} - volume de distribuição no compartimento periférico, para a CZP nanoencapsulada. Q_{1NC} e Q_{2NC} - Clearance intercompartimental, para a CZP nanoencapsulada. K_r – constante de liberação da CZP a partir da nanocápsula; K_{rfc} – constante de retorno do fármaco livre liberado a partir das nanocápsulas no compartimento periférico para compartimento central.

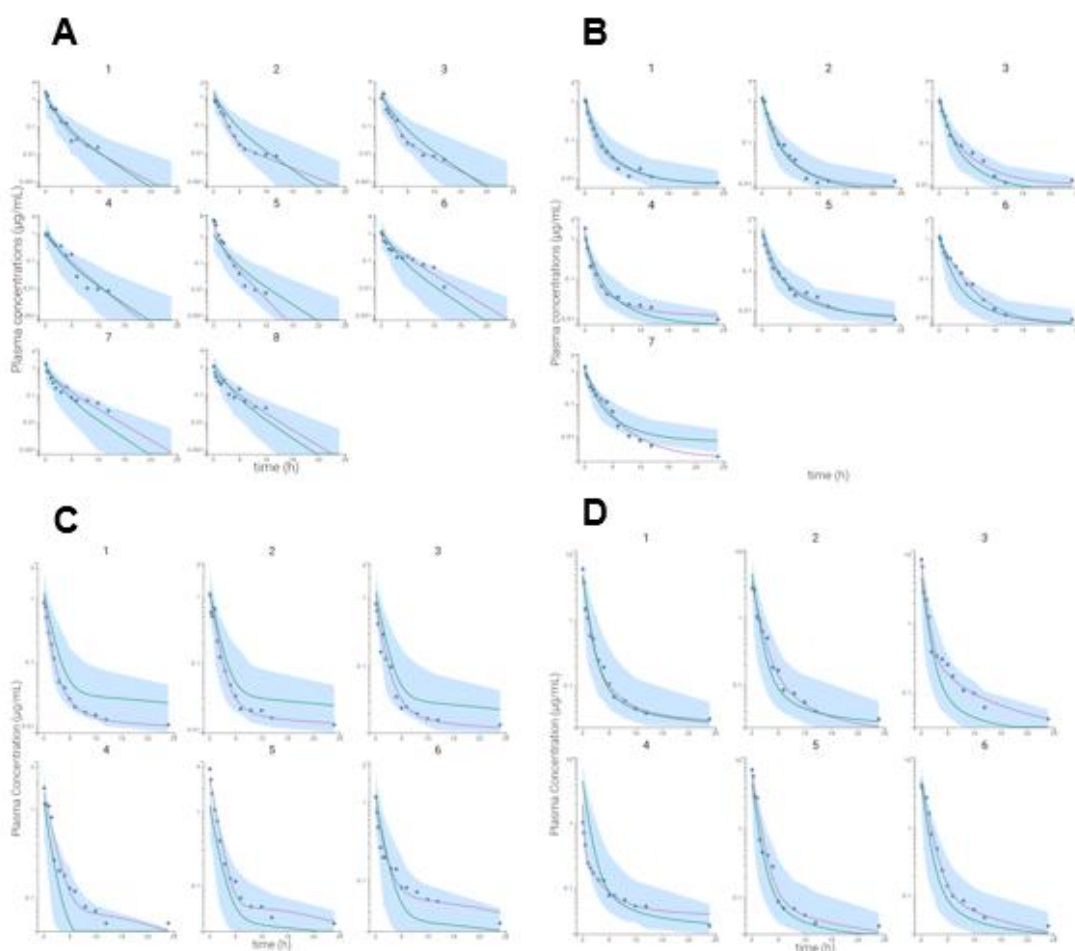


Figura 2. Perfis plasmáticos individuais e populacionais modelados, após dose I.P. *bolus* de 5 mg/kg de A. CZP livre; B. NCCZP. C. NCCZP-PEG e D. NCCZP-CS. Pontos azuis: Observações; Linha roxa: perfil individual modelado; linha verde: perfil populacional modelado; sombreado azul: intervalo de previsão de 90 %.

3.2 Modelagem farmacocinética populacional de nanocápsulas contendo clozapina

Um total de 102 observações de dados plasmáticos para NCCZP (n=7/grupo), 90 para NCCZP-PEG (n=6/grupo) e 90 para NCCZP-CS (6/grupo) foram obtidos. Seguindo a análise sequencial, os parâmetros populacionais estimados na análise anterior foram fixados nos modelos subsequentes. A variabilidade residual não explicada foi melhor descrita como proporcional, apresentando uma distribuição normal dos dados. Uma variabilidade foi incluída em K_{fpc} e Q_{NC} .

Os grupos NCCZP e NCCZP-PEG foram descritos utilizando um modelo bicompartimental, associado ao modelo estrutural descrito para a CZP livre (Figura 1B). Neste modelo estrutural foi considerado que as formulações contendo NCCZP e NCCZP-PEG, ao serem administradas pela via intravenosa, assumem diferentes “rotas” dependendo se o fármaco está nanoencapsulado ou livre na formulação, por esse motivo foi agregado a fração de taxa nanoencapsulada (F_{NC}) obtida do estudo anterior (Vieira *et al.*, 2016). Sendo assim, NCCZP e NCCZP-PEG podem liberar o fármaco no plasma no próprio compartimento central, através de K_r , ou ser distribuído a um compartimento periférico. Além disso, o modelo demonstra que pode ocorrer liberação do fármaco a partir da NC no compartimento periférico e ser redistribuído ao compartimento central, com microconstante de velocidade K_{fpc} .

O valor obtido de K_r para as formulações NCCZP e NCCZP-PEG, foi de 0.218 h^{-1} e seguiu uma liberação de primeira ordem com percentual de liberação máxima ($F_{m\acute{a}x}$). No entanto, para o modelo populacional *in vivo*, o $F_{m\acute{a}x}$ não foi considerado, pois foi assumido uma condição *Sink*. Seguindo a modelagem sequencial, os valores populacionais estão na Tabela 1. Os valores de V_{1NC} para NCCZP e NCCZP-PEG foram de 1.13 e 0.97 L.kg^{-1} , respectivamente e são muito próximos do valor estimado para V_1 do grupo CZP livre (1.04 L.kg^{-1}). O valor de Q_{NC} foi semelhante entre o grupo NCCZP e NCCZP-PEG (1.21 e 0.914 L/h/kg , respectivamente). Quanto ao valor obtido para V_{2NC} para NCCZP foi de 36.4 L.kg^{-1} , enquanto que para NCCZP-PEG foi de 59 L.kg^{-1} , demonstrando diferença na distribuição dessas NCs, entre si e quando comparadas à CZP livre (0.253 L.kg^{-1}). Já a K_{fpc} estimada para NCCZP foi menor (0.004 h^{-1}), quando comparado a NCCZP-PEG ($0,02 \text{ h}^{-1}$), demonstrando que este processo é mais lento para NCCZP.

Para NCCZP-CS, um modelo tricompartmental associado ao modelo definido para CZP livre, com eliminação linear (Figura 1C) descreveu melhor o comportamento da NCCZP-CS. Neste modelo, a formulação contendo NCCZP-CS ao ser administrada I.V. *bolus*, assim como no modelo proposto para NCCZP e NCCZP-PEG, pode liberar o fármaco no compartimento central, com constante de velocidade definida por K_r , ou ser distribuída (Q_{NC} ou Q_{2NC}) a compartimentos periféricos (V_{2NC} ou V_{3NC}). Diferentemente do modelo proposto para NCCZP e NCCZP-PEG, não foi possível estimar K_{fpc} . Um erro proporcional com dados normalmente distribuídos se ajustou melhor ao modelo e variabilidade interindividual

foi incluída em Q_{NC} , V_{1NC} e Q_{2NC} . O valor obtido de K_r foi de 0.375 h^{-1} com liberação de primeira ordem e $F_{m\acute{a}x}$. Os parâmetros estimados (Tabela 1.) demonstram um V_{1NC} e V_{2NC} relativamente baixo ($0,21$ e $0,36 \text{ L.kg}^{-1}$, respectivamente) quando comparado aos demais grupos e V_{3NC} de $19,1 \text{ L.kg}^{-1}$, demonstrando uma distribuição diferenciada para este compartimento. Além disso, os valores obtidos para Q_{NC} e Q_{2NC} demonstram velocidades diferentes na transferência de NCs entre os compartimentos periféricos (0.0294 e 0.176 L/h/kg).

A Figura 2A-D demonstra os perfis plasmáticos individuais e populacionais modelados, dentro de um intervalo de previsão de 90 %. Todos os parâmetros nos modelos propostos para NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS foram estimados com boa precisão (Tabela 1), conforme indicado pelos valores do desvio padrão relativo (RSE%) e os gráficos de qualidade de ajuste (Figuras 3A-D e 4A-D).

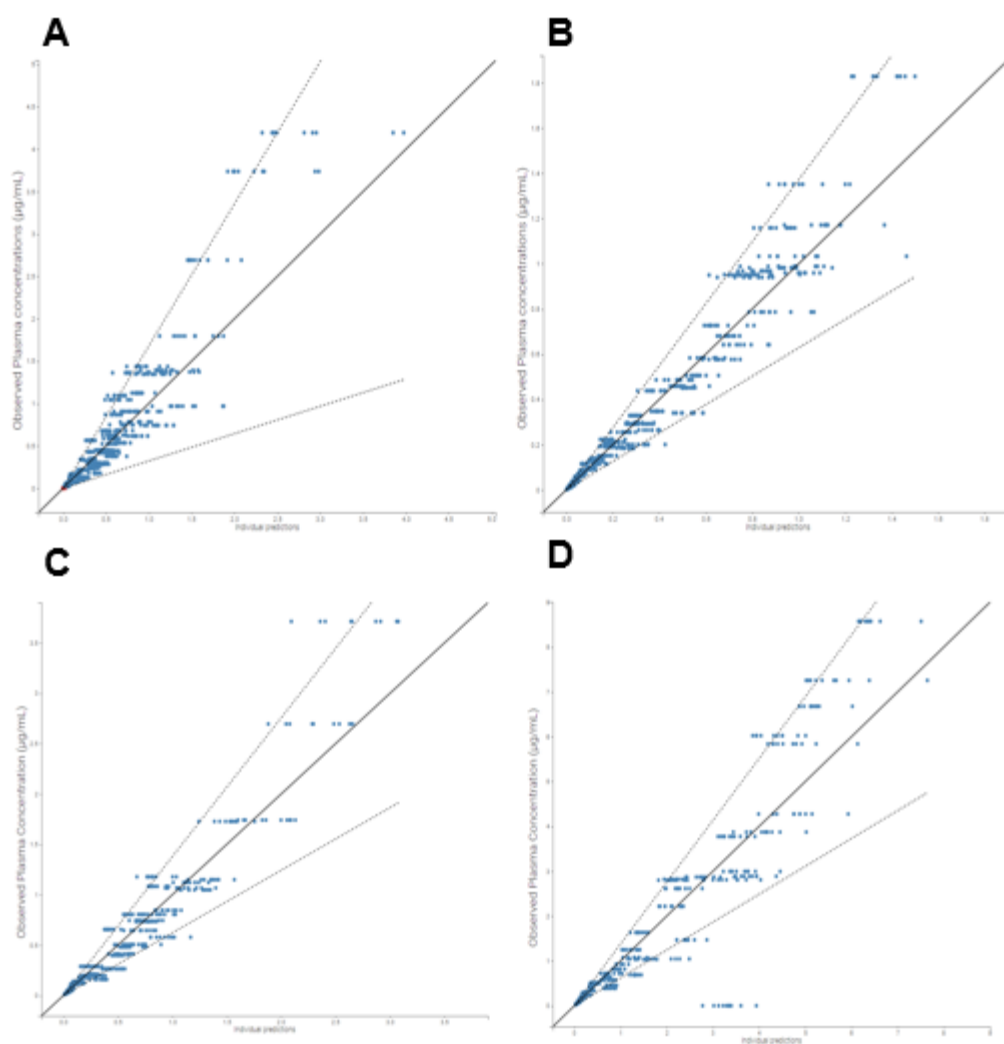


Figura 3. Gráficos de qualidade de ajuste do modelo popPK final para previsões individuais, onde A. CZP livre; B. NCCZP; C. NCCZP-PEG e D. NCCZP-CS. No gráfico, a linha preta representa regressão linear e linha pontilhada representa o intervalo de previsão de 90%.

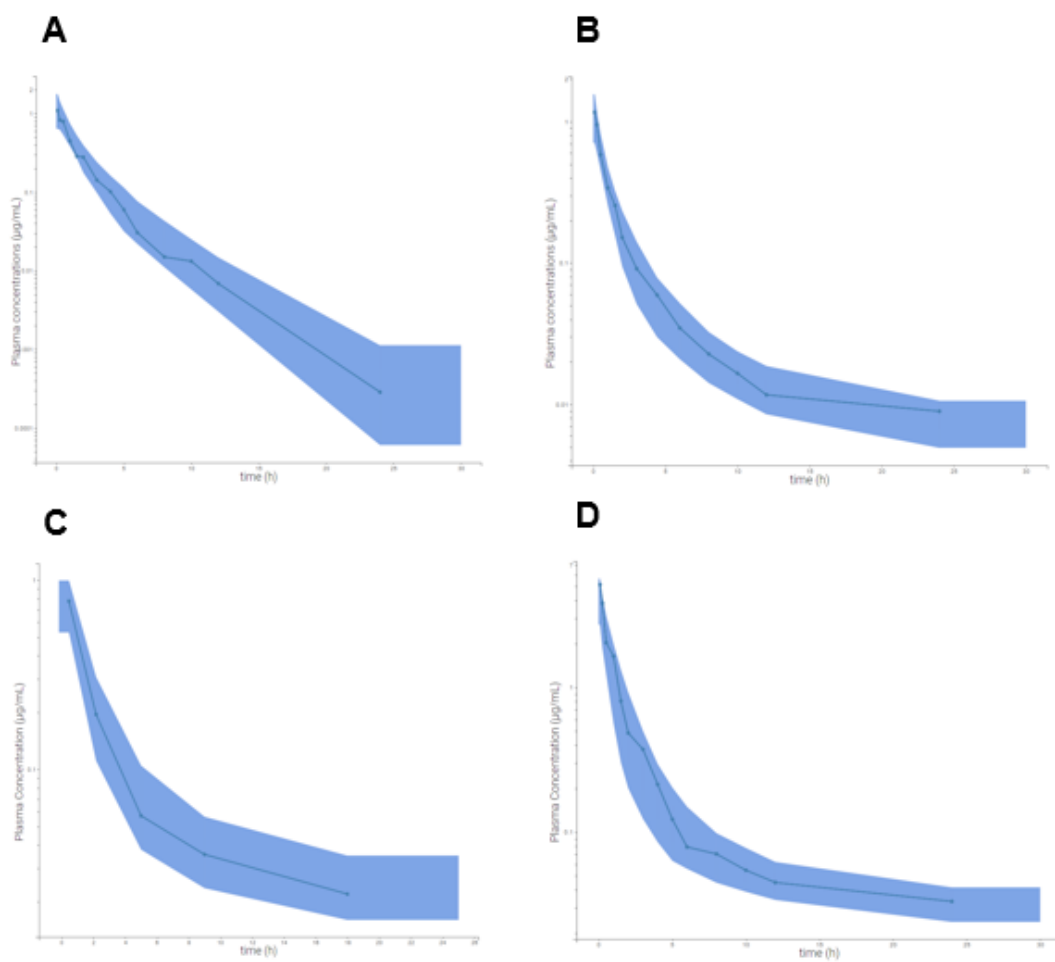


Figura 4. Visual Predictive Check (VPC) do modelo final de popPK baseado em replica dos dados originais de A. CZP livre; B. NCCZP. C. NCCZP-PEG e D.NCCZP-CS. A linha sólida representa a média das previsões e a área azul sombreada representa o intervalo de previsão de 50 %

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos populacionais estimados

PARAMETER	UNIT	Free CZP		NCCZP		NCCZP-PEG		NCCZP-CS	
		VALUE	R.S.E. (%)	VALUE	R.S.E. (%)	VALUE	R.S.E. (%)	VALUE	R.S.E. (%)
Cl_{pop}	L/h/kg	0.62	12.5	0.62	NA	0.62	NA	0.62	NA
V_{1pop}	L/kg	1.04	22.4	1.04	NA	1.04	NA	1.04	NA
Q_{pop}	L/h/kg	0.0995	28.4	0.0995	NA	0.0995	NA	0.0995	NA
V_{2pop}	L/kg	0.253	26.1	0.253	NA	0.253	NA	0.253	NA
k_r	h^{-1}	NA	NA	0.218 ^a		0.218 ^a		0.375 ^a	
F_{NC}		NA	NA	0.96 ^b		0.98 ^b		0.68 ^b	
$Q_{NC\ pop}$	L/h/kg	NA	NA	1.21	13.1	0.914	25	0.0294	28.8
$Q_{2NC\ pop}$	L/h/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.176	47.9
$V_{1NC\ pop}$	L/kg	NA	NA	1.13	8.68	0.979	20.8	0.21	24.7
$V_{2NC\ pop}$	L/kg	NA	NA	36.4	24.4	59	45.4	0.363	49.3
$V_{3NC\ pop}$	L/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19.1	17
$k_{fpc\ pop}$	h^{-1}	NA	NA	0.00478	21.4	0.0212	34.4	NA	NA
ω_{Cl}	L/h/kg	0.205	45.5	0.205	NA	0.205	NA	0.205	NA
ω_{V_1}	L/kg	0.528	64.3	0.528	NA	0.528	NA	0.528	NA
ω_{V_2}	L/kg	0.486	18.7	0.486	NA	0.486	NA	0.486	NA
$\omega_{k_{fpc}}$	h^{-1}	NA	NA	0.457	40.7	0.765	34.8	NA	NA
$\omega_{Q_{NC}}$	L/h/kg	NA	NA	0.326	30.3	0.601	29.9	0.232	95.7
$\omega_{V_{1NC}}$	L/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.5	32.6
$\omega_{Q_{2NC}}$	L/h/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.15	29.5
Error		Proportional Normal		Proportional Normal		Proportional Normal		Proportional Normal	
b		0.414	7.78	0.226	8.48	0.23	8.88	0.23	8.92
- 2 LL		-248.33		-412.14		-287.24		-157.37	
AIC		-232.33		-400.14		-275.24		-139.37	

Onde: Cl – clearance. V_1 – volume de distribuição no compartimento central. V_2 – volume de distribuição no compartimento periférico. Q – Clearance intercompartimental. V_{1NC} – volume de distribuição no compartimento central. V_{2NC} e V_{3NC} – volume de distribuição no compartimento periférico. Q_{NC} e Q_{2NC} – Clearance intercompartimental. K_r – constante de liberação da NC; K_{fpc} – constante de retorno do fármaco livre liberada no compartimento periférico para compartimento central. ω – variabilidade interindividual. NA – Não se aplica. – 2LL – log-likelihood. AIC – critério de informação de Akaike. ^a – Valor estimado com DDSolver®. ^b – Valor obtido por Vieira *et al.* (2016)

ao compartimento central. ω – variabilidade interindividual. NA – Não se aplica. – 2LL – log-likelihood. AIC – critério de informação de Akaike. ^a – Valor estimado com DDsolver®.
^b – Valor obtido por Vieira *et al.* (2016)

3.3 Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica populacional (PopPK/PD)

Um total de 36 observações movimentos de cabeça para Free CZP, 45 para NCCZP (n=7/grupo), 38 para NCCZP-PEG (n=7/grupo) e 39 para NCCZP-CS (7/grupo) foram obtidos. Devido ao atraso observado no efeito em relação às concentrações plasmáticas, foram testados modelos de compartimentos de efeito e *turnover*, bem como diferentes erros residuais e graus de inibição do fármaco (inibição total ou parcial). Valores observados do movimento de cabeça acima de 100 % foram ignorados, pois foram consideradas estimativas equivocadas, possivelmente ocasionada pela reaplicação de anfetamina, com a finalidade de manter o estado psicótico dos animais. Os parâmetros popPK e erros obtidos anteriormente para cada um dos grupos (de acordo com a Tabela 1) foram fixados, seguindo uma abordagem sequencial (De Witte *et al.*, 2018).

Um modelo de *turnover*, com inibição máxima ($I_{max} = 1$) foi o modelo que melhor descreveu a relação popPK/PK observada entre a concentração *versus* efeito para os grupos tratados com CZP livre, NCCZP e NCCZP-PEG. Para o grupo NCCZP-CS, no entanto, um modelo de *turnover* com inibição parcial ($I_{max} = 0.978$) foi o que apresentou melhor ajuste aos dados. Todos os grupos foram modelados utilizando variabilidade residual constante. O grupo CZP livre apresentou uma distribuição lognormal, enquanto os demais foram melhores descritos com distribuição normal. As estimativas finais dos parâmetros estão resumidas na Tabela 2. Os valores de R_0 não variaram entre os grupos, sendo mais baixo para NCCZP-PEG e mais alto para NCCZP e (84 e 109 %, respectivamente).

O valor de k_{out} foi pouco menor para NCCZP-CS (0.18 h^{-1}) enquanto que para os demais grupos apresentou-se em torno de 0.24 h^{-1} . Já a nanoencapsulação apresentou grande redução nos valores obtidos para IC_{50} , quando comparado com o grupo CZP livre ($IC_{50} = 0.997 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$). O valor obtido para IC_{50} do grupo NCCZP-CS foi aproximadamente 30 vezes menor que o valor estimado para CZP livre, enquanto que NCCZP e NCCZP-PEG demonstraram uma redução de aproximadamente 10 vezes em relação à CZP livre. A Figura 5 demonstra o perfil individual e populacional modelado, dentro de um intervalo de previsão de 90%. Todos os grupos

apresentaram as estimativas para os parâmetros PD R.S.E. % satisfatórios, conforme apresentado na Tabela 2. Entretanto, a variabilidade interindividual para o grupo NCCZP-CS não foi possível de ser quantificada com precisão, devido alto R.S.E. %. Os gráficos de qualidade de ajuste para todos os grupos estão demonstrados nas figuras 6 e 7.

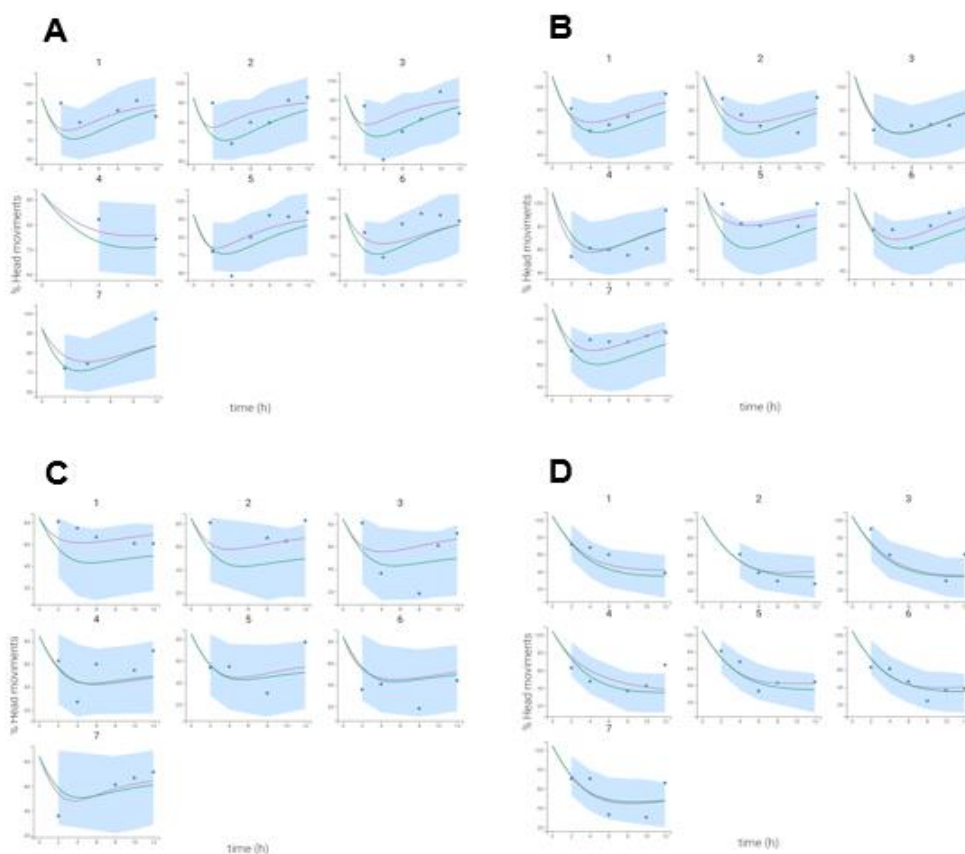


Figura 5. Perfis de movimento de cabeça individuais e populacionais modelados, após dose I.P. *bolus* de 5 mg/kg de A. CZP livre; B. NCCZP. C. NCCZP-PEG e D. NCCZP-CS. Pontos azuis: Observações; Linha roxa: perfil individual modelado; linha verde: perfil populacional modelado; sombreado azul: intervalo de previsão de 90 %.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos populacionais obtidos

	UNIT	Free CZP		NCCZP		NCCZP-PEG		NCCZP-CS	
		VALUE	R.S.E. (%)	VALUE	R.S.E. (%)	VALUE	R.S.E. (%)	VALUE	R.S.E. (%)
$I_{max\ pop}$		1	NA	1	NA	1	NA	0.978	11.5
$R0_{pop}$	%	92.5	2.44	109	7.64	84.6	16.3	105	14.4
$k_{out\ pop}$	h^{-1}	0.245	22.2	0.235	17.7	0.23	37.3	0.188	32.9
$IC_{50\ pop}$	$\mu g/mL$	0.997	0.102	0.0996	37.3	0.0961	66.1	0.0364	44.5
ωI_{max}		NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.13	526
ωk_{out}	h^{-1}	NA	NA	0.293	53.4	0.352	114	0.066	500
ωIC_{50}	$\mu g/mL$	NA	NA	0.39	40.2	NA	NA	0.13	627
Error		Constant LogNormal		Constant Normal		Constant Normal		Constant Normal	
a2		0.11	12.8	8.84	14.2	16.4	14.5	12.1	14.8
-2 LL		52.99		-24.17		18.39		175.44	
AIC		60.99		-12.17		28.39		191.44	

Onde: I_{max} – Inibição máxima observada pelo fármaco. $R0$ – Valor de linha de base. k_{out} constante de degradação da resposta (primeira ordem). IC_{50} – quantidade de fármaco necessário para obter 50% da resposta máxima. ω – variabilidade interindividual. NA – Não se aplica. – 2LL – log-likelihood. AIC: critério de informação de Akaike

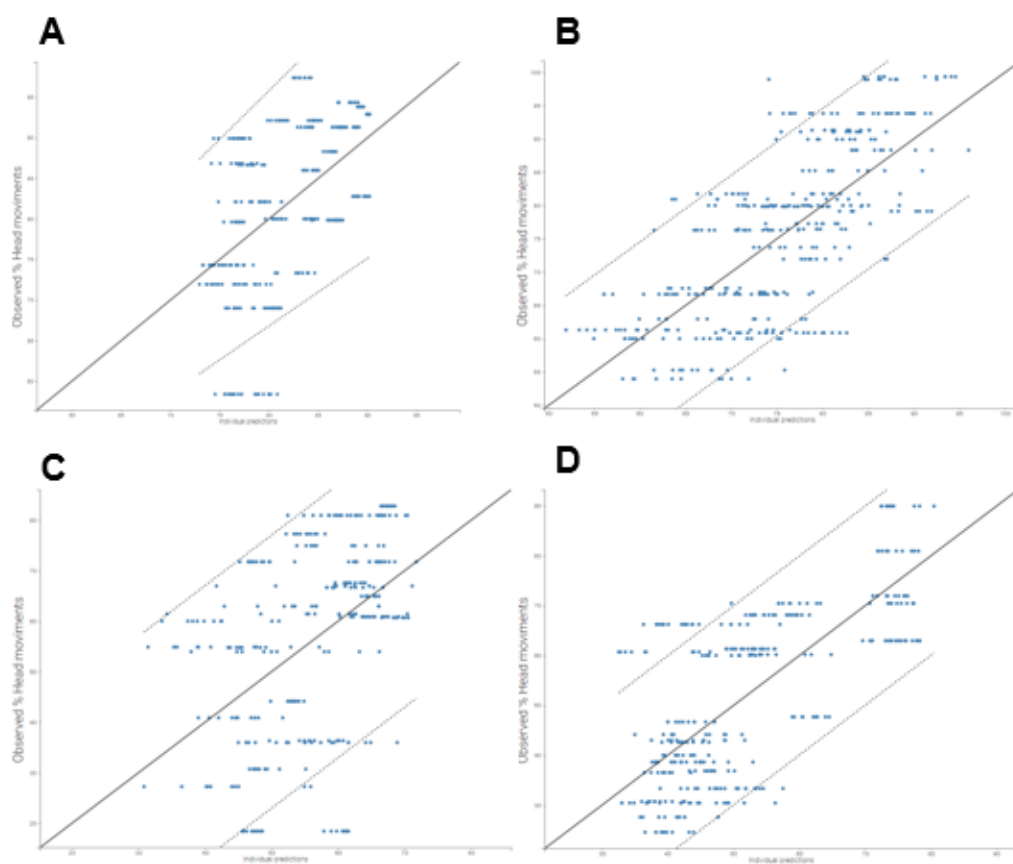


Figura 6. Gráficos de qualidade de ajuste do modelo popPK/PD final para previsões individuais, onde A. CZP livre; B. NCCZP; C. NCCZP-PEG e D. NCCZP-CS. No gráfico, a linha preta representa regressão linear e linha pontilhada representa o intervalo de previsão de 90%.

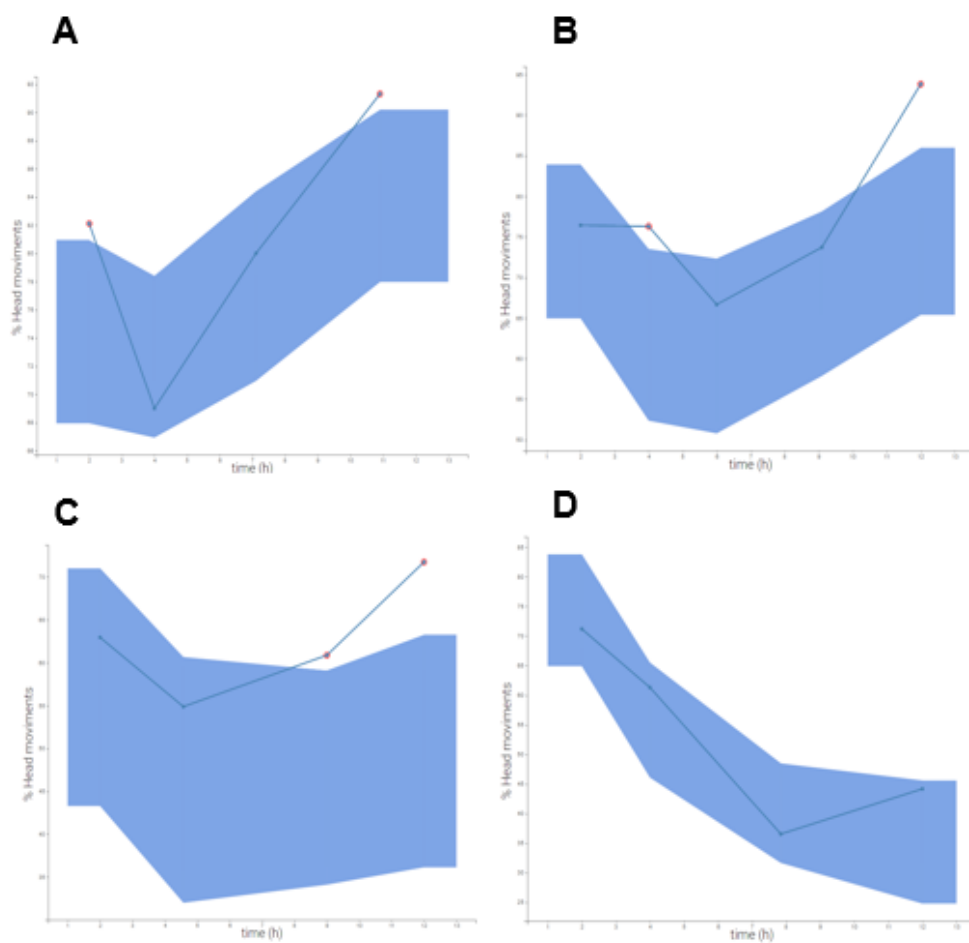


Figura 7. Visual Predictive Check (VPC) do modelo final de popPK/PD baseado em replica dos dados originais de A. CZP livre; B. NCCZP. C. NCCZP-PEG e D. NCCZP-CS. A linha sólida representa a média das previsões, a área azul sombreada representa o intervalo de previsão de 50 % e pontos vermelhos representam *outliers*.

4. DISCUSSÃO

Anteriormente demonstramos que a nanoencapsulação promoveu melhora da resposta, evidenciada pela redução significativa do movimento de cabeça, com aumento da duração do efeito para NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS, comparado ao grupo tratado com CZP livre (Vieira *et al.*, 2016), entretanto ainda não tínhamos uma relação popPK/PD. O presente trabalho visou estabelecer uma relação dose-exposição-resposta de clozapina nanoencapsulada com diferentes revestimentos, que possa ser útil na tomada de decisões durante as etapas pré-clínicas. Este é o primeiro relato na literatura encontrado em que compara o comportamento da clozapina livre e nanoencapsulada, considerando a variabilidade existente entre os indivíduos, utilizando uma abordagem popPK/PD sequencial.

Sabe-se que a BHE constitui um dos grandes desafios para o sucesso terapêutico de muitos fármacos que atuam no SNC (Gabathuler, 2010). Por outro lado, a nanotecnologia vem como uma estratégia que pode contribuir no *delivery* cerebral de antipsicóticos, a partir da modulação dos processos farmacocinéticos, incluindo a distribuição do fármaco pelos diferentes tecidos (Barua e Mitragotri, 2014). Estudos demonstram que a nanoencapsulação de fármacos promove um aumento da exposição plasmática, alterações no volume de distribuição, podendo levar a um acúmulo maior do fármaco em determinados tecidos, incluindo cérebro (Manjunath e Venkateswarlu, 2005; Freddo, 2009; Dimer *et al.*, 2015; Carreño *et al.*, 2016a; Carreño *et al.*, 2016b). Concentrações maiores do fármaco na biofase de interesse estão relacionados a melhor eficácia, resultando em doses menores para se obter efeitos máximos.

NCs administradas intravascularmente devem atender alguns requisitos mínimos, como a habilidade de permanecer por mais tempo na corrente sanguínea, sem que estas partículas sejam captadas e depuradas SFM e garantir que a quantidade de fármaco presente numa dose seja capaz de ser internalizada pelas células alvo (Duan e Li, 2013). Estes requisitos podem ser modulados a partir de modificações nas características físico-químicas, como tamanho e formato da partícula e propriedades de superfície das nanopartículas (Ganesan *et al.*, 2018).

O P80 é um tensoativo não iônico que, assim como o PEG, é capaz de influenciar significativamente a opsonização, fagocitose e a biodistribuição das nanopartículas (Joseph e Saha, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Estudos de mecanismo demonstram que o P80 causa um rompimento temporário e parcial da BHE, redução da expressão da proteína de efluxo glicoproteína-P (P-gp) e permeação dependente de apolipoproteína E (ApoE) que, em conjunto, facilitam a endocitose pelas células endoteliais dos capilares do cérebro (Zensi *et al.*, 2009; Benvegnú *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2018). Enquanto que o PEG atua como transportador de longa duração por evitar reconhecimento pelo SFM, devido a barreira estérica conferida pelo revestimento, o que facilita penetração das nanopartículas contendo fármaco antes de ser reconhecida pelos macrófagos (Zahr *et al.*, 2006; Łukasiewicz *et al.*, 2017). A CS é um biopolímero catiônico que confere carga positiva à partícula, onde são observadas características interessantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade mediada pela interação eletrostática da CS com a carga negativa de resíduos membranares, o que facilita a endocitose (Nagpal *et al.*, 2010; Ishak *et al.*, 2013).

Através de um modelo popPK, Carreño (2019) demonstrou que sistemas nanoparticulados podem liberar *in vivo* o fármaco no plasma com duas constantes distintas de primeira ordem, dependendo se o fármaco se encontra adsorvido às paredes do polímero ou disperso no núcleo lipídico da NC e este pode, ainda, se distribuir para diferentes tecidos, incluindo o cérebro, liberando fármaco nesses locais com velocidade distinta do plasma. Uma forma simples de prever o comportamento *in vivo* e obter informações sobre seu mecanismo e cinética de liberação do fármaco é utilizar o teste liberação *in vitro* (D'souza, 2014).

Diferentes polímeros promovem diferentes velocidades de liberação do fármaco. Anteriormente (Vieira *et al.*, 2016), foi evidenciado modificação na cinética de liberação da CZP livre e nanoencapsulada em pH 7.4, sendo assim, foi proposto estimar a velocidade com que o fármaco se libera no plasma, a partir das NCs, e fixá-la aos diferentes modelos utilizando os percentuais de liberação do fármaco *versus* tempo para NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS, através dos valores de K_r (Tabela 1.). Os valores obtidos de K_r , utilizando a fórmula do tempo de meia vida do processo ($t_{1/2} K_r = 0.693/K_r$), demonstram uma liberação mais rápida de NCCZP-CS dentro do compartimento central (1.84 h), quando comparado com NCCZP e

NCCZP-PEG (3.17 h). Além disso, também foram fixados aos modelos os valores obtidos da F_{NC} (Tabela 1.), obtidos a partir de valores de Eficiência de Encapsulação (Vieira *et al.*, 2016), com a finalidade de estabelecer a relação da quantidade de fármaco livre/nanoencapsulado presente na formulação administrada.

No presente estudo, empregamos uma abordagem popPK sequencial, fixando os parâmetros estimados para Free CZP com o objetivo de condicionar as estimativas de parâmetros popPK dos grupos nanoencapsulados. Para isso, os valores obtidos da quantidade de fármaco nanoencapsulado (F_{NC}) e constante de liberação K_r do fármaco da nanocápsula foram fixados e novos compartimentos para NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS foram incorporados aos modelos. Dado tamanho de partícula apresentado pelas NCs, de aproximadamente 140 nm (Vieira *et al.*, 2016), foi considerado que não há eliminação do fármaco enquanto estiver nanoencapsulado. Esta hipótese é sustentada pelo endotélio fenestrado presente nos glomérulos e túbulos renais, que apresenta um tamanho de poro que varia de 50 a 60 nm (Féléto, 2011; Barua e Mitragotri, 2014), e que o tamanho de corte para a eliminação renal de partículas é de, aproximadamente, 10 nm (Longmire *et al.*, 2008). Note que para os modelos finais de NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS (Figura 1B e 1C) foi mantida a estrutura básica estabelecida para CZP livre, pois foi assumido que uma vez liberada da NC, a CZP livre se comportará da mesma maneira, independentemente da formulação administrada.

Os valores estimados para V_1 e V_{1NC} (Tabela 1.) demonstraram que a distribuição pelo compartimento central é semelhante entre CZP livre ($V_1 = 1,04 \text{ L.kg}^{-1}$), NCCZP ($V_{1NC} = 1,13 \text{ L.kg}^{-1}$) e NCCZP-PEG ($V_{1NC} = 0,98 \text{ L.kg}^{-1}$), mas não para NCCZP-CS ($V_{1NC} = 0,21 \text{ L/Kg}$). Enquanto NCCZP-PEG apresentou maior capacidade de se distribuir pelo compartimento periférico ($V_{2NC} = 59 \text{ L.kg}^{-1}$). Esses resultados estão de acordo com os relatados anteriormente (Vieira *et al.*, 2016), em que foi observado distribuição semelhante no compartimento central entre os grupos CZP livre, NCCZP e NCCZP-PEG, mas não para NCCZP-CS e um volume de distribuição no estado estacionário (V_{dss}) semelhante entre CZP livre e NCCZP-CS, enquanto que NCCZP-PEG apresentou maior capacidade maior de se distribuir (Vieira *et al.*, 2016).

Além disso, a K_{fpc} estimada para NCCZP-PEG ($K_{fpc} = 0.02 \text{ h}^{-1}$) foi, aproximadamente, 5 vezes maior que K_{fpc} estimada para NCCZP ($K_{fpc}=0.004 \text{ h}^{-1}$),

demonstrando um retorno mais rápido ao compartimento central, o que pode estar relacionada com a velocidade de liberação do fármaco dentro dos diferentes tecidos (Carreño, 2019). Em conjunto estes resultados podem explicar os resultados observados no teste de eficácia farmacológica (Vieira *et al.*, 2016) em que foi observado uma redução maior e do movimento de cabeça com prolongamento do efeito, pelo grupo NCCZP-PEG, quando comparado com NCCZP. Manjunath e Venkateswarlu (2005) avaliaram a distribuição da CZP livre e nanopartículas lipídicas sólidas contendo CZP (SLN-CZP), em diferentes tecidos, após a dose de 20 mg.kg⁻¹ I.V., em camundongos. Os autores demonstraram que a nanoencapsulação foi capaz de aumentar a exposição plasmática ao fármaco e melhorar a penetração da CZP pela BHE, aumentando a concentração do fármaco no cérebro, o que corrobora com nossas observações. Resultados semelhantes foram observado por Dimer *et al.* (2015), utilizando nanocápsulas com núcleo lipídico contendo olanzapina (OLA-LNC).

Para caracterizar a relação popPK/PD, os valores obtidos anteriormente na popPK foram fixados para cada um dos grupos, a fim de condicionar a resposta popPD (De Witte *et al.*, 2018). Foi assumido biodisponibilidade igual entre as vias I.V. e intraperitoneal. Comumente os atrasos na observação da resposta, onde a concentração máxima e o de pico estão deslocadas, são descritos por um modelo de compartimentos de feito (Upton e Mould, 2014; De Witte *et al.*, 2018). Olsen *et al.* (2008) e Parker *et al.* (2001) descreveram a relação PK/PD da CZP, em ratos, com um modelo de compartimentos de efeito, empregando uma abordagem clássica e populacional. Os valores relatados para IC₅₀ pelos autores, para a CZP livre, foram próximos dos valores estimados no presente estudo, entretanto foi necessário empregar um modelo de *Turnover* com inibição da produção da resposta. Este tipo de modelo está relacionado às taxas lentas de ativação e desativação de receptores, responsáveis pelo início e término de uma resposta (Kapur e Seeman, 2000). Os gráficos de qualidade de ajuste para os dados de movimento de cabeça em modelo de estereotipia induzida por anfetamina (figura 7) demonstraram alguns pontos superestimados (*outliers*), o que pode ser atribuído à quantidade limitada de dados (média de 39 observações por grupo). Além disso, biomarcadores endógenos parecem caracterizar melhor a resposta (Upton e Mould, 2014).

O modelo de *turnover* com inibição máxima demonstrou que a NCCZP e NCCZP-PEG apresentaram uma redução de aproximadamente 10 vezes na IC_{50} ($0.0996 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0.0961 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Já NCCZP-CS, não demonstrou uma inibição máxima, embora muito próxima ($I_{\text{max}} = 0.98$) apresentando uma redução de 30 vezes na IC_{50} ($0.0364 \mu\text{g.mL}^{-1}$), quando comparado ao grupo Free CZP ($0.997 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes resultados podem estar relacionados com os diferentes mecanismos de penetração na BHE pelos revestimentos e ao aumento da exposição cerebral observado pelo fármaco nanoencapsulado (Manjunath e Venkateswarlu, 2005; Dimer *et al.*, 2015). Além disso, o valor obtido de K_{out} para NCCZP-CS, utilizando a fórmula de meia vida do processo ($t_{1/2} K_{\text{out}}$) sugere também um retorno mais lento ao nível basal, em torno de 3,7 h, enquanto que para Free CZP, NCCZP e NCCZP-PEG foi de 2.87, 2.94 e 3.01, respectivamente, o que pode explicar o prolongamento da resposta observada para o fármaco nanoencapsulado observado por (Vieira *et al.*, 2016) no estudo de eficácia farmacológica (Upton e Mould, 2014).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a nanoencapsulação promoveu alterações no comportamento popPK, modificando a distribuição da CZP para todos os grupos. A partir na popPKPD sequencial, foi observado melhora no *delivery* do fármaco, evidenciado pela redução no IC₅₀ para todos os grupos, considerando a mesma dose do fármaco livre. Em conjunto, estes resultados demonstram uma disposição/afinidade diferenciada ocasionada pelos diferentes revestimentos, sugerindo NCCZP, NCCZP-PEG e NCCZP-CS terapeuticamente promissores na terapia farmacológica para pacientes com esquizofrenia, uma vez que doses menores serão necessárias para obter resultados máximos, podendo simplificar efeitos adversos associados à terapia com CZP.

6. REFERÊNCIAS

BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects. **Nano today**, v. 9, n. 2, p. 223-243, 2014. ISSN 1748-0132.

BENVEGNÚ, D. M. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 332-336, 2011. ISSN 0939-6411.

BOUW, M. R.; GÅRDMARK, M.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats—a microdialysis study. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 10, p. 1220-1227, 2000. ISSN 0724-8741.

BOWSKILL, S. et al. Plasma clozapine and norclozapine in relation to prescribed dose and other factors in patients aged 65 years and over: data from a therapeutic drug monitoring service, 1996–2010. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 27, n. 3, p. 277-283, 2012a. ISSN 0885-6222.

BOWSKILL, S. V. et al. Plasma amisulpride in relation to prescribed dose, clozapine augmentation, and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 2002–2010. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 27, n. 5, p. 507-513, 2012. ISSN 0885-6222.

BREIER, A. et al. Effects of clozapine on positive and negative symptoms in outpatients with schizophrenia. **The American journal of psychiatry**, 1994. ISSN 1535-7228.

CARREÑO, F. et al. Pharmacokinetic investigation of quetiapine transport across blood–brain barrier mediated by lipid core nanocapsules using brain microdialysis in rats. **Molecular pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 1289-1297, 2016a. ISSN 1543-8384.

CARREÑO, F. et al. Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 119, p. 152-158, 2016b. ISSN 0731-7085.

CARREÑO, F. O. Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) da quetiapina nanoencapsulada em modelo animal de esquizofrenia. 2019.

CHAIKIN, P. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics in drug development: an industrial perspective. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 12, p. 1428-1438, 2000. ISSN 0091-2700.

CHENG, Y. et al. Clinical pharmacokinetics of clozapine in chronic schizophrenic patients. **European journal of clinical pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 445-449, 1988. ISSN 0031-6970.

CHOC, M. G. et al. Single-vs multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in psychiatric patients. **Pharmaceutical research**, v. 7, n. 4, p. 347-351, 1990. ISSN 0724-8741.

COOPER, R. E. et al. Psychosocial interventions for people with schizophrenia or psychosis on minimal or no antipsychotic medication: A systematic review. **Schizophrenia research**, 2019. ISSN 0920-9964.

D'SOUZA, S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, 2014. ISSN 2356-6841.

DA COSTA GÜLLICH, A. A. et al. Clozapine linked to nanocapsules minimizes tissue and oxidative damage to biomolecules lipids, proteins and DNA in brain of rats Wistar. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 3, p. 695-702, 2015. ISSN 0885-7490.

DE BERARDIS, D. et al. Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 9, n. 5, p. 237-256, 2018. ISSN 2042-0986.

DE WITTE, W. E. et al. Modelling the delay between pharmacokinetics and eeg effects of morphine in rats: binding kinetic versus effect compartment models. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, v. 45, n. 4, p. 621-635, 2018. ISSN 1567-567X.

DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation improves relative bioavailability and antipsychotic effect of olanzapine in rats. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1482-1493, 2015. ISSN 1550-7033.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, v. 9, n. 9 - 10, p. 1521-1532, 2013. ISSN 1613-6810.

FÉLÉTOU, M. The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function, 2011, Morgan & Claypool Life Sciences. p.1-306.

FREDDO, R. J. Estudos para obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração deste através da barreira hematoencefálica. 2009.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 48-57, 2010. ISSN 0969-9961.

GANESAN, P. et al. Recent developments in solid lipid nanoparticle and surface-modified solid lipid nanoparticle delivery systems for oral delivery of phyto-bioactive compounds in various chronic diseases. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1569, 2018.

GOMES, G. S. et al. Optimization of curcuma oil/quinine-loaded nanocapsules for malaria treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 551-564, 2018. ISSN 1530-9932.

HÄGG, S. et al. Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 59-63, 2000. ISSN 0306-5251.

HOWES, O. D. et al. Treatment-resistant schizophrenia: treatment response and resistance in psychosis (TRRIP) working group consensus guidelines on diagnosis and terminology. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 3, p. 216-229, 2017. ISSN 0002-953X.

HUKKANEN, J. et al. Effect of nicotine on cytochrome P450 1A2 activity. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 836-838, 2011. ISSN 0306-5251.

ISHAK, R. A. et al. A comparative study of chitosan shielding effect on nano-carriers hydrophilicity and biodistribution. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 669-676, 2013. ISSN 0144-8617.

JOSEPH, E.; SAHA, R. N. Investigations on pharmacokinetics and biodistribution of polymeric and solid lipid nanoparticulate systems of atypical antipsychotic drug: effect of material used and surface modification. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 4, p. 678-686, 2017. ISSN 0363-9045.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 161, 2000.

LI, L.-J. et al. Population pharmacokinetics of clozapine and its primary metabolite norclozapine in Chinese patients with schizophrenia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 11, p. 1409-1416, 2012. ISSN 1745-7254.

LI, Y. et al. Mechanisms of enhanced antiangioma efficacy of polysorbate 80 - modified paclitaxel - loaded PLGA nanoparticles by focused ultrasound. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 9, p. 4171-4182, 2018. ISSN 1582-1838.

LINDQVIST, A.; FRIDÉN, M.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Pharmacokinetic considerations of nanodelivery to the brain: Using modeling and simulations to predict the outcome of liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 173-182, 2016. ISSN 0928-0987.

LONGMIRE, M.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. 2008. ISSN 1743-5889.

ŁUKASIEWICZ, S. et al. The interaction of clozapine loaded nanocapsules with the hCMEC/D3 cells–In vitro model of blood brain barrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 200-210, 2017. ISSN 0927-7765.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 2, p. 215-228, 2005. ISSN 0168-3659.

MELTZER, H.; MASSEY, B. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 59-67, 2011. ISSN 1471-4892.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010. ISSN 0009-2363.

NG, W.; KENNAR, R.; UETRECHT, J. Effect of clozapine and olanzapine on neutrophil kinetics: implications for drug-induced agranulocytosis. **Chemical research in toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1104-1108, 2014. ISSN 0893-228X.

NG, W. et al. Clozapine exposure and the impact of smoking and gender: a population pharmacokinetic study. **Therapeutic drug monitoring**, v. 31, n. 3, p. 360-366, 2009. ISSN 0163-4356.

OLESEN, O. V.; LINNET, K. Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N - demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 8, p. 823-832, 2001. ISSN 0091-2700.

OLSEN, C. K.; BRENNUM, L. T.; KREILGAARD, M. Using pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling as a tool for prediction of therapeutic effective plasma levels of antipsychotics. **European journal of pharmacology**, v. 584, n. 2-3, p. 318-327, 2008. ISSN 0014-2999.

PARKER, T. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling in the early development phase of anti-psychotics: a comparison of the effects of clozapine, S 16924 and S 18327 in the EEG model in rats. **British journal of pharmacology**, v. 132, n. 1, p. 151, 2001.

RAASKA, K. et al. Effect of caffeine - containing versus decaffeinated coffee on serum clozapine concentrations in hospitalised patients. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 94, n. 1, p. 13-18, 2004. ISSN 1742-7835.

SHANG, D.-W. et al. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic model of clozapine for characterizing the relationship between accumulated exposure and PANSS scores in patients with schizophrenia. **Therapeutic drug monitoring**, v. 36, n. 3, p. 378-386, 2014. ISSN 0163-4356.

TALY, A. Novel approaches to drug design for the treatment of schizophrenia. **Expert opinion on drug discovery**, v. 8, n. 10, p. 1285-1296, 2013. ISSN 1746-0441.

TREPANIER, M. et al. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 8, p. 1009-1026, 2016. ISSN 1476-5578.

UPTON, R.; MOULD, D. Basic concepts in population modeling, simulation, and model - based drug development: part 3-introduction to pharmacodynamic modeling methods. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2014. ISSN 2163-8306.

VANASSE, A. et al. Comparative effectiveness and safety of antipsychotic drugs in schizophrenia treatment: a real - world observational study. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 134, n. 5, p. 374-384, 2016. ISSN 0001-690X.

VELASQUES, K. et al. Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against Plasmodium falciparum and decreases their toxicity to Caenorhabditis elegans. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 118, p. 1-12, 2018. ISSN 0928-0987.

VIEIRA, S. M. et al. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: a study of formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 748-756, 2016. ISSN 0927-7765.

ZHR, A. S.; DAVIS, C. A.; PISHKO, M. V. Macrophage uptake of core– shell nanoparticles surface modified with poly (ethylene glycol). **Langmuir**, v. 22, n. 19, p. 8178-8185, 2006. ISSN 0743-7463.

ZENSI, A. et al. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 137, n. 1, p. 78-86, 2009. ISSN 0168-3659.

ZHOU, H. et al. Dense and dynamic polyethylene glycol shells cloak nanoparticles from uptake by liver endothelial cells for long blood circulation. **ACS nano**, v. 12, n. 10, p. 10130-10141, 2018. ISSN 1936-0851.

4. DISCUSSÃO GERAL

Doenças mentais como a esquizofrenia acometem milhares de pessoas pelo mundo todo, acarretando dificuldades no desenvolvimento interpessoal para esses indivíduos. Embora haja um arsenal terapêutico bem estabelecido, grande parte das medicações possuem efeitos colaterais que podem sobrepor os sintomas da doença. Apesar da CZP ainda ser o antipsicótico de melhor eficácia clínica, possui grande variabilidade observada nos níveis de exposição ao fármaco, o que pode resultar em concentrações subterapêuticas ou tóxicas.

A utilização de da nanotecnologia vem como uma estratégia interessante para *delivery* cerebral de fármacos que atuam SNC, pois tendem a ser mais estáveis e seletivos, a partir da modulação das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas das partículas carreadoras de fármaco (Barua e Mitragotri, 2014). A utilização destes sistemas tem o potencial de melhorar parâmetros farmacocinéticos, facilitar a passagem de fármacos pela BHE e aumentar a exposição do cérebro ao fármaco (Manjunath e Venkateswarlu, 2005; Dimer *et al.*, 2015; Carreño *et al.*, 2016a).

A utilização de abordagens popPK vem sendo recomendada pela agência regulatória americana Food and Drug Administration, há mais de duas décadas, com a finalidade de otimizar a P&D na busca de novos fármacos, bem como personalização de esquema posológico, pois permitem identificar as fontes de variabilidade inter e intraindividual que interferem na segurança e eficácia do medicamento. Recentemente foi publicado uma orientação revisada sobre os requisitos e modelos para análises de farmacocinética popPK como parte de novos pedidos de medicamentos e pedidos de licença biológica (FDA, 2019)

Em estudo publicado anteriormente no nosso grupo de pesquisa, foi evidenciado diferenças na avaliação farmacocinética e de eficácia farmacológica, entre os grupos nanoencapsulados e o fármaco livre, na mesma dose, bem como redução de efeitos tóxicos que enquanto Sanches Moraes *et al.* (2016) e Da Costa Güllich *et al.* (2015) observaram redução de danos tóxicos causados pelo fármaco, em modelo alternativo e ratos machos wistar. Estes resultados, em conjunto, sugerem que a utilização de nanocápsulas contendo clozapina possa ser promissora no tratamento da esquizofrenia (Vieira *et al.*, 2016). Dados na literatura relataram que a nanoencapsulação de antipsicóticos aumentou a exposição cerebral, sítio de

ação alvo desta classe de medicamentos, o que melhora a eficácia farmacológica (Manjunath e Venkateswarlu, 2005; Dimer *et al.*, 2015).

Neste trabalho desenvolvemos um modelo popPK/PD sequencial em duas partes. A primeira constituiu-se da descrição de um modelo matemático capaz de descrever o comportamento da CZP nanoencapsulada para os diferentes revestimentos, mantendo a estrutura básica proposta para o fármaco livre. Consideramos a fração nanoencapsulada (FNC) e coeficiente de liberação (K_r) para cada grupo revestido, pois a dissolução das matrizes polimérica ocorre de forma diferenciada entre os grupos, obtidos de estudo *in vitro* publicado anteriormente (Vieira *et al.*, 2016).

A partir da descrição matemática do modelo, foi possível observar que a nanoencapsulação aumentou o volume de distribuição do fármaco para todos os grupos, corroborando com os achados por (Vieira *et al.*, 2016), especialmente para NCCZP-PEG. Também foi observado um comportamento semelhante entre os grupos NCCZP e NCCZP-PEG, onde foi melhor descrito por um modelo bicompartimental com liberação central e periférica do fármaco. Já o grupo NCCZP-CS apresentou um comportamento tricompartmental, sem liberação periférica, demonstrando concentrar-se no compartimento central.

A segunda etapa do presente estudo definiu um modelo de *turnover*, com inibição máxima da resposta, como modelo popPK/PD que melhor descreveu as observações da avaliação da eficácia farmacológica para CZP, NCCZP e NCCZP-PEG, em que foi avaliado o número de movimentos de cabeça no teste de pseudo-psicose induzido por anfetamina obtido por (Vieira *et al.*, 2016). Já o grupo NCCZP-CS foi descrito com inibição parcial, embora o valor obtido seja próximo a 100%. Atrasos na observação da resposta são comumente descritos utilizando um modelo de compartimentos de efeito (Upton e Mould, 2014; De Witte *et al.*, 2018). Olsen *et al.* (2008) e Parker *et al.* (2001) descreveram a relação PK/PD da CZP, em ratos, com um modelo de compartimentos de efeito, empregando uma abordagem clássica e populacional, respectivamente (Parker *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2008), entretanto este modelo não se adequou ao nosso conjunto de dados.

Anteriormente foi evidenciado um prolongamento de efeito para os grupos nanoencapsulados, inicialmente atribuído à modulação farmacocinética, onde foi observado aumento de exposição com consequente diminuição do *clearance*,

especialmente para os grupos NCCZP-PEG e NCCZP-CS (Vieira *et al.*, 2016). NCs administradas intravascularmente devem permanecer por mais tempo na corrente sanguínea, sem que estas partículas sejam captadas e depuradas pelo SFM e garantir que a quantidade de fármaco administrada seja capaz de ser internalizada pelas células no sítio alvo (Duan e Li, 2013). O PEG, assim como o P80, é capaz de influenciar a opsonização, fagocitose e a biodistribuição das nanopartículas (Joseph e Saha, 2017; Zhou *et al.*, 2018), conferindo uma barreira estérica à nanopartícula, atuando como transportador de longa duração, por evitar reconhecimento pelo SFM, o que facilita penetração do nanossistema contendo fármaco, antes de ser reconhecida pelos macrófagos (Zahr *et al.*, 2006; Łukasiewicz *et al.*, 2017). Já a CS é um biopolímero catiônico que confere carga positiva à partícula, onde se observa mucoadesividade mediada pela interação eletrostática da CS com a carga negativa da mucina, presente na mucosa dos epitélios (Nagpal *et al.*, 2010; Ishak *et al.*, 2013).

A partir da modelagem popPK/PD observamos que este prolongamento de efeito pode estar, também, correlacionado com o modo que o fármaco interage com os receptores (Upton e Mould, 2014), uma vez que o valor obtido de K_{out} para NCCZP-CS, utilizando a fórmula de meia vida do processo ($t_{1/2} K_{out}$) demonstrou um retorno mais lento ao nível basal, em torno de 3,7 h, o que pode explicar o prolongamento da resposta observada para o fármaco nanoencapsulado, no estudo de eficácia farmacológica. Além disso, os valores obtidos para IC_{50} demonstram que a nanoencapsulação promoveu maior potência, pois foi observado redução de 10 vezes para NCCZP e NCCZP-PEG e 30 vezes para NCCZP-CS quando comparado a mesma dose do fármaco livre, ou seja, a doses menores atingiram efeitos máximos.

5. CONCLUSÃO GERAL

Por fim, até onde sabemos, este é o primeiro relato onde foi realizado uma comparação popPK/PD entre diferentes sistemas nanoparticulados. Estes resultados demonstraram que a nanoencapsulação da CZP promoveu aumento do volume de distribuição do fármaco e sugeriu maior acúmulo no SNC, evidenciado pela redução nos valores estimados de IC_{50} . Ainda, foi observado prolongamento da atividade antipsicótica, especialmente para NCCZP-CS, caracterizado pelo prolongamento no tempo de meia vida da constante da remoção da resposta. Em conjunto o estudo sugere que a implementação desses sistemas é terapeuticamente promissora. Como perspectivas, espera-se determinar a concentração cerebral da CZP e expandir o modelo estrutural, a fim de fornecer maiores informações da capacidade de penetração destes nanocarreadores no SNC.

6. REFERÊNCIAS

BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; BARLOW, P. W. **Cell-cell channels**. Springer, 2006. ISBN 0387469575.

BARBOT, A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sequential intravenous and subcutaneous teicoplanin in critically ill patients without vasopressors. **Intensive care medicine**, v. 29, n. 9, p. 1528-1534, 2003. ISSN 0342-4642.

BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects. **Nano today**, v. 9, n. 2, p. 223-243, 2014. ISSN 1748-0132.

BENVEGNÚ, D. M. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 332-336, 2011. ISSN 0939-6411.

BIGOS, K. L. et al. Population pharmacokinetics of antipsychotics. In: (Ed.). **Antipsychotic Trials in Schizophrenia: The CATIE Project**: Cambridge University Press, 2010. p.267-280.

BONATE, P. **Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation**. New York: Springer Science, 2011. ISBN 978-1-4419-9484-4.

BOUW, M. R.; GÅRDMARK, M.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats—a microdialysis study. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 10, p. 1220-1227, 2000. ISSN 0724-8741.

BOWSKILL, S. et al. Plasma clozapine and norclozapine in relation to prescribed dose and other factors in patients aged 65 years and over: data from a therapeutic drug monitoring service, 1996–2010. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 27, n. 3, p. 277-283, 2012a. ISSN 0885-6222.

BOWSKILL, S. V. et al. Plasma amisulpride in relation to prescribed dose, clozapine augmentation, and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 2002–2010. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 27, n. 5, p. 507-513, 2012. ISSN 0885-6222.

BREIER, A. et al. Effects of clozapine on positive and negative symptoms in outpatients with schizophrenia. **The American journal of psychiatry**, 1994. ISSN 1535-7228.

CAI, Z. et al. Nanocarriers: a general strategy for enhancement of oral bioavailability of poorly absorbed or pre-systemically metabolized drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 11, n. 2, p. 197-207, 2010. ISSN 1389-2002.

CARREÑO, F. et al. Pharmacokinetic investigation of quetiapine transport across blood-brain barrier mediated by lipid core nanocapsules using brain microdialysis in rats. **Molecular pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 1289-1297, 2016a. ISSN 1543-8384.

CARREÑO, F. et al. Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 119, p. 152-158, 2016b. ISSN 0731-7085.

CARREÑO, F. O. Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) da quetiapina nanoencapsulada em modelo animal de esquizofrenia. 2019.

CHAIKIN, P. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics in drug development: an industrial perspective. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 12, p. 1428-1438, 2000. ISSN 0091-2700.

CHENG, Y. et al. Clinical pharmacokinetics of clozapine in chronic schizophrenic patients. **European journal of clinical pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 445-449, 1988. ISSN 0031-6970.

CHOC, M. G. et al. Single-vs multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in psychiatric patients. **Pharmaceutical research**, v. 7, n. 4, p. 347-351, 1990. ISSN 0724-8741.

CLAGHORN, J. et al. The risks and benefits of clozapine versus chlorpromazine. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 377-384, 1987. ISSN 0271-0749.

COOPER, R. E. et al. Psychosocial interventions for people with schizophrenia or psychosis on minimal or no antipsychotic medication: A systematic review. **Schizophrenia research**, 2019. ISSN 0920-9964.

D'SOUZA, S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, 2014. ISSN 2356-6841.

DA COSTA GÜLLICH, A. A. et al. Clozapine linked to nanocapsules minimizes tissue and oxidative damage to biomolecules lipids, proteins and DNA in brain of rats Wistar. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 3, p. 695-702, 2015. ISSN 0885-7490.

DE BERARDIS, D. et al. Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 9, n. 5, p. 237-256, 2018. ISSN 2042-0986.

DE WITTE, W. E. et al. Modelling the delay between pharmacokinetics and eeg effects of morphine in rats: binding kinetic versus effect compartment models. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, v. 45, n. 4, p. 621-635, 2018. ISSN 1567-567X.

DERENDORF, H. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 12, p. 1399-1418, 2000. ISSN 0091-2700.

DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation improves relative bioavailability and antipsychotic effect of olanzapine in rats. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1482-1493, 2015. ISSN 1550-7033.

DOST, F. H. **Der Blutspiegel: Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit**. Georg Thieme, 1953.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, v. 9, n. 9 - 10, p. 1521-1532, 2013. ISSN 1613-6810.

ETTE, E. I.; WILLIAMS, P. J. **Pharmacometrics: the science of quantitative pharmacology**. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-471-67783-3.

FÉLÉTOU, M. The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function, 2011, Morgan & Claypool Life Sciences. p.1-306.

FREDDO, R. J. Estudos para obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração deste através da barreira hematoencefálica. 2009.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 48-57, 2010. ISSN 0969-9961.

GANESAN, P. et al. Recent developments in solid lipid nanoparticle and surface-modified solid lipid nanoparticle delivery systems for oral delivery of phyto-bioactive compounds

in various chronic diseases. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1569, 2018.

GOMES, G. S. et al. Optimization of curcuma oil/quinine-loaded nanocapsules for malaria treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 551-564, 2018. ISSN 1530-9932.

HÄGG, S. et al. Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 59-63, 2000. ISSN 0306-5251.

HIGUCHI, C. H. et al. Factor structure of the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) in Brazil: convergent validation of the Brazilian version. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 36, n. 4, p. 336-339, 2014. ISSN 1516-4446.

HOWES, O. D. et al. Treatment-resistant schizophrenia: treatment response and resistance in psychosis (TRRIP) working group consensus guidelines on diagnosis and terminology. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 3, p. 216-229, 2017. ISSN 0002-953X.

HUKKANEN, J. et al. Effect of nicotine on cytochrome P450 1A2 activity. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 836-838, 2011. ISSN 0306-5251.

ISHAK, R. A. et al. A comparative study of chitosan shielding effect on nano-carriers hydrophilicity and biodistribution. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 669-676, 2013. ISSN 0144-8617.

JOSEPH, E.; SAHA, R. N. Investigations on pharmacokinetics and biodistribution of polymeric and solid lipid nanoparticulate systems of atypical antipsychotic drug: effect of material used and surface modification. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 4, p. 678-686, 2017. ISSN 0363-9045.

KANE, J.; CORRELL, C. Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 9, p. 1115, 2010.

KANE, J. et al. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. **Archives of general psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 789-796, 1988. ISSN 0003-990X.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 161, 2000.

LI, C. H. et al. Prediction of brain clozapine and norclozapine concentrations in humans from a scaled pharmacokinetic model for rat brain and plasma pharmacokinetics. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 203, 2014. ISSN 1479-5876.

LI, L.-J. et al. Population pharmacokinetics of clozapine and its primary metabolite norclozapine in Chinese patients with schizophrenia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 11, p. 1409-1416, 2012. ISSN 1745-7254.

LI, Y. et al. Mechanisms of enhanced anti glioma efficacy of polysorbate 80 - modified paclitaxel - loaded PLGA nanoparticles by focused ultrasound. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 9, p. 4171-4182, 2018. ISSN 1582-1838.

LINDQVIST, A.; FRIDÉN, M.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Pharmacokinetic considerations of nanodelivery to the brain: Using modeling and simulations to predict the outcome of liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 173-182, 2016. ISSN 0928-0987.

LINNET, K.; OLESEN, O. V. Metabolism of clozapine by cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes. **Drug metabolism and disposition**, v. 25, n. 12, p. 1379-1382, 1997. ISSN 0090-9556.

LONGMIRE, M.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. 2008. ISSN 1743-5889.

ŁUKASIEWICZ, S. et al. The interaction of clozapine loaded nanocapsules with the hCMEC/D3 cells–In vitro model of blood brain barrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 200-210, 2017. ISSN 0927-7765.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 2, p. 215-228, 2005. ISSN 0168-3659.

MARTIN-BANDERAS, L. et al. In vitro and in vivo evaluation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy. **International journal of pharmaceutics**, v. 487, n. 1-2, p. 205-212, 2015. ISSN 0378-5173.

MELTZER, H.; MASSEY, B. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 59-67, 2011. ISSN 1471-4892.

MIAN, P. et al. Population pharmacokinetic modelling of intravenous paracetamol in fit older people displays extensive unexplained variability. **British journal of clinical pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 126-135, 2019. ISSN 0306-5251.

MICHELS, L. R. et al. Effects of Surface Characteristics of Polymeric Nanocapsules on the Pharmacokinetics and Efficacy of Antimalarial Quinine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 10165, 2019.

MIYAMOTO, S.; JARSKOG, L. F.; FLEISCHHACKER, W. W. New therapeutic approaches for treatment-resistant schizophrenia: a look to the future. **Journal of psychiatric research**, v. 58, p. 1-6, 2014. ISSN 0022-3956.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010. ISSN 0009-2363.

NELSON, E. Kinetics of drug absorption, distribution, metabolism, and excretion. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 50, n. 3, p. 181-192, 1961. ISSN 0022-3549.

NG, W.; KENNAR, R.; UETRECHT, J. Effect of clozapine and olanzapine on neutrophil kinetics: implications for drug-induced agranulocytosis. **Chemical research in toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1104-1108, 2014. ISSN 0893-228X.

NG, W. et al. Clozapine exposure and the impact of smoking and gender: a population pharmacokinetic study. **Therapeutic drug monitoring**, v. 31, n. 3, p. 360-366, 2009. ISSN 0163-4356.

OLESEN, O. V.; LINNET, K. Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N - demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 8, p. 823-832, 2001. ISSN 0091-2700.

OLMOS, I. et al. Population pharmacokinetics of clozapine and norclozapine and switchability assessment between brands in Uruguayan patients with schizophrenia. **BioMed research international**, v. 2019, 2019. ISSN 2314-6133.

OLSEN, C. K.; BRENNUM, L. T.; KREILGAARD, M. Using pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling as a tool for prediction of therapeutic effective plasma levels of antipsychotics. **European journal of pharmacology**, v. 584, n. 2-3, p. 318-327, 2008. ISSN 0014-2999.

OWEN, J. S.; FIEDLER-KELLY, J. **Introduction to population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis with nonlinear mixed effects models**. John Wiley & Sons, 2014. ISBN 1118784618.

PARKER, T. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling in the early development phase of anti-psychotics: a comparison of the effects of clozapine, S 16924 and S 18327 in the EEG model in rats. **British journal of pharmacology**, v. 132, n. 1, p. 151, 2001.

PATEL, K. R. et al. Schizophrenia: overview and treatment options. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 9, p. 638, 2014.

RAASKA, K. et al. Effect of caffeine - containing versus decaffeinated coffee on serum clozapine concentrations in hospitalised patients. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 94, n. 1, p. 13-18, 2004. ISSN 1742-7835.

RAEDLER, T. J.; HINKELMANN, K.; WIEDEMANN, K. Variability of the In Vivo Metabolism of Clozapine. **Clinical Neuropharmacology**, v. 31, n. 6, p. 347-352, 2008. ISSN 0362-5664. Disponível em: <
https://journals.lww.com/clinicalneuropharm/Fulltext/2008/11000/Variability_of_the_In_Vivo_Metabolism_of_Clozapine.5.aspx>.

SANCHES MORAES, B. K. et al. Clozapine-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules: physico-chemical characterization and toxicity evaluation in *Caenorhabditis elegans* model. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1257-1264, 2016. ISSN 1533-4880.

SHANG, D.-W. et al. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic model of clozapine for characterizing the relationship between accumulated exposure and PANSS scores in patients with schizophrenia. **Therapeutic drug monitoring**, v. 36, n. 3, p. 378-386, 2014. ISSN 0163-4356.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 2005. **Mc Graw Hill**, v. 37, p. 45-46,

SHEINER, L.; STEIMER, J.-L. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug development. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 40, n. 1, p. 67-95, 2000. ISSN 0362-1642.

SHEINER, L. B. et al. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d - tubocurarine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 358-371, 1979. ISSN 0009-9236.

STORPIRTIS, S. et al. **Farmacocinética básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. ISBN 978-85-277-1896-7.

TALY, A. Novel approaches to drug design for the treatment of schizophrenia. **Expert opinion on drug discovery**, v. 8, n. 10, p. 1285-1296, 2013. ISSN 1746-0441.

TEORELL, T. Kinetics of distribution of substances administered to the body, II: the intravascular modes of administration. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 57, p. 226-240, 1937.

_____. Kinetics of distribution of substances administered to the body, II: the intravascular modes of administration. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 57, p. 226-240, 1937a.

TORRES, B. G. et al. Population pharmacokinetic modeling as a tool to characterize the decrease in ciprofloxacin free interstitial levels caused by pseudomonas aeruginosa biofilm lung infection in wistar rats. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e02553-16, 2017. ISSN 0066-4804.

TREPANIER, M. et al. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 8, p. 1009-1026, 2016. ISSN 1476-5578.

UPTON, R.; MOULD, D. Basic concepts in population modeling, simulation, and model - based drug development: part 3-introduction to pharmacodynamic modeling methods. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2014. ISSN 2163-8306.

VAN TROOSTWIJK, L. J. D. et al. CYP1A2 activity is an important determinant of clozapine dosage in schizophrenic patients. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 4-5, p. 451-457, 2003. ISSN 0928-0987.

VANASSE, A. et al. Comparative effectiveness and safety of antipsychotic drugs in schizophrenia treatment: a real - world observational study. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 134, n. 5, p. 374-384, 2016. ISSN 0001-690X.

VELASQUES, K. et al. Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against Plasmodium falciparum and decreases their toxicity to Caenorhabditis elegans. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 118, p. 1-12, 2018. ISSN 0928-0987.

VIEIRA, S. M. et al. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: a study of formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 748-756, 2016. ISSN 0927-7765.

WENTHUR, C. J.; LINDSLEY, C. W. Classics in chemical neuroscience: clozapine. **ACS Chem Neurosci**, v. 4, n. 7, p. 1018-25, Jul 17 2013. ISSN 1948-7193 (Electronic)

1948-7193 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24047509>>.

YELLEPEDDI, V. K.; KUMAR, A.; PALAKURTHI, S. Surface modified poly (amido) amine dendrimers as diverse nanomolecules for biomedical applications. **Expert opinion on drug delivery**, v. 6, n. 8, p. 835-850, 2009. ISSN 1742-5247.

ZAHR, A. S.; DAVIS, C. A.; PISHKO, M. V. Macrophage uptake of core– shell nanoparticles surface modified with poly (ethylene glycol). **Langmuir**, v. 22, n. 19, p. 8178-8185, 2006. ISSN 0743-7463.

ZENSI, A. et al. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 137, n. 1, p. 78-86, 2009. ISSN 0168-3659.

ZHANG, H. et al. Pharmacokinetic drug interactions involving 17 α -ethinylestradiol. **Clinical pharmacokinetics**, v. 46, n. 2, p. 133-157, 2007. ISSN 0312-5963.

ZHANG, L.; BEAL, S. L.; SHEINER, L. B. Simultaneous vs. sequential analysis for population PK/PD data I: best-case performance. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, v. 30, n. 6, p. 387-404, 2003. ISSN 1567-567X.

ZHOU, H. et al. Dense and dynamic polyethylene glycol shells cloak nanoparticles from uptake by liver endothelial cells for long blood circulation. **ACS nano**, v. 12, n. 10, p. 10130-10141, 2018. ISSN 1936-0851.

ZIMMERMANN, E. S. et al. Population pharmacokinetic modeling to establish the role of P-glycoprotein on ciprofloxacin distribution to lung and prostate following intravenous and intratracheal administration to Wistar rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 319-329, 2019. ISSN 0928-0987.