

Trabalho 1

Modelação de um sistema de terapia de cancro



Imagem: freepik.com

Autores:

André Teodósio : 99889

↪ andre.teodosio@tecnico.ulisboa.pt

Francisco Carvalho : 99941

↪ franciscosoaresc@tecnico.ulisboa.pt

João Gonçalves : 99995

↪ jrazevedogoncalves@tecnico.ulisboa.pt

Teresa Nogueira : 100029

↪ maria.teresa.ramos.nogueira@tecnico.ulisboa.pt

Docente:

João Silvestre

O grupo de alunos acima identificado garante que o texto deste relatório e todo o software e resultados entregues foram inteiramente realizados pelos elementos do grupo, com uma participação significativa de todos eles, e que nenhuma parte do trabalho ou do software e resultados apresentados foi obtida a partir de outras pessoas ou fontes.

Dezembro 2022

P1 | Simulação do modelo PK (método de Euler)

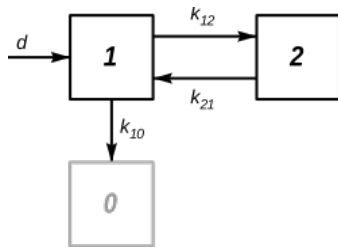


Fig. 1: Modelo compartimental (Imagem: Guia Laboratorial).

A farmacocinética (PK) é responsável por determinar o destino das substâncias administradas no organismo e, portanto, os perfis¹ de tempo de concentração de substâncias no corpo.

Tomando uma *mechanistic modeling*[1], consideramos o modelo PK exposto (constantes definidas no Guia**):

$$\begin{bmatrix} \dot{c}_1 \\ \dot{c}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{V_1}(-K_{12} - K_{10}) & \frac{1}{V_1}K_{21} \\ \frac{1}{V_2}K_{12} & -\frac{1}{V_2}K_{21} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \frac{1}{V_1} \\ 0 \end{bmatrix} \delta d \quad (1)$$

Pergunta 1 - Modelo PK (método de Euler)

```

1 %% Define variables
2 % (...)
3 %% Create f function -> c(t)' = f(c,d)
4 f = @(c,d)[
5     (1/V*(-K12-K10)*c(1,:)+1/V*K21*c(2,:)+delta/V*d);
6     (1/V*K12*c(1,:) - 1/V*K21*c(2,:))];
7
8 %% P1
9 Euler(f,t,h,d,size);
10 function Euler(f,t,h,d,size)
11     % Preallocation
12     c = zeros(2,size-1);
13     % Simple Euler's integration
14     for i = 1:(size-1)
15         c(:,i+1) = c(:,i) + h*f(c(:,i),d(i));
16     end
17     % Plot PK
18     figure(), plot(t,c(1,:)), hold on;
19     plot(t,c(2,:)), plot(t,d);
20     % (...)
21 end

```

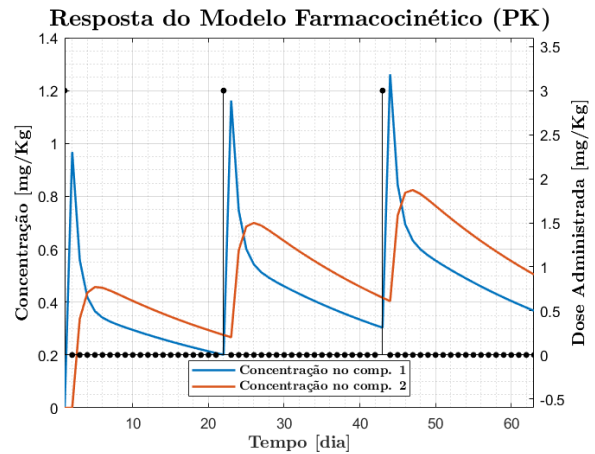


Fig. 2: Concentrações nos compartimentos 1 e 2, e dose administrada com um período de $T = 21$ d.

Verifica-se que a administração de uma dose do fármaco, aumenta rapidamente c_1 , correspondendo à fase de absorção do medicamento pelo organismo. Em seguida, observa-se a fase de distribuição, em que a substância é distribuída ao longo do corpo, entranhando-se na(s) zona(s) de atuação, o que corresponde à diminuição de c_1 e aumento de c_2 . Esta variação é proeminente logo após a administração, uma vez que a diferença de concentrações se verifica mais acentuada. A terceira fase observada corresponde à fase de excreção/metabolismo do organismo, onde ambas as concentrações diminuem.

P2 | Efeito do fármaco em função da dose (modelo PD)

A farmacodinâmica (PD) permite descrever a relação² entre o efeito de um fármaco (u) e a sua concentração (C_p) no compartimento de efeito. O modelo PD é amplamente representado pela equação de Hill[2]:

$$u \triangleq u_{max} \frac{C_p^\alpha(t)}{C_{50}^\alpha + C_p^\alpha(t)} \quad (2)$$

onde u_{max} é o efeito máximo do fármaco (tipicamente um valor unitário[1]), C_{50} a concentração para qual 50% do efeito máximo é obtido³, e α denota o coeficiente de Hill que determina a *steepness* da sigmoide resultante.

¹Estes perfis dependem de uma panóplia de fatores relacionados com propriedades da substância e à forma como o organismo reage inerentemente a esta; bem como do método de administração.[1]

²Contribui para a compreensão da resposta medicamentosa e da sua eficácia.

³Considera-se $C_{50} = 7.1903$ mg/kg (Atezolizumab)[3][1].

Efeito do fármaco em função da sua concentração no comp. 2 em escala semi-logarítmica

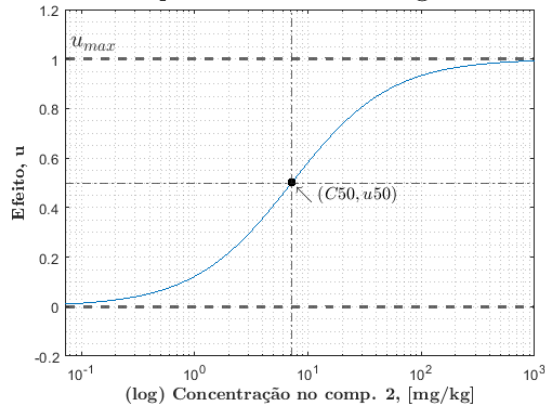


Fig. 3: Efeito do fármaco em função de C_p em escala semi-logarítmica⁴ (com os níveis de saturação salientados), para $\alpha = 1$, $u_{max} = 1$ e $C_{50} = 7.1903$ (**★ valores considerados ao longo do relatório**).

“O que é que não é um veneno? Todas as coisas são veneno e nada é sem veneno. Somente a dose determina que algo não seja um veneno.”

(Paracelso)

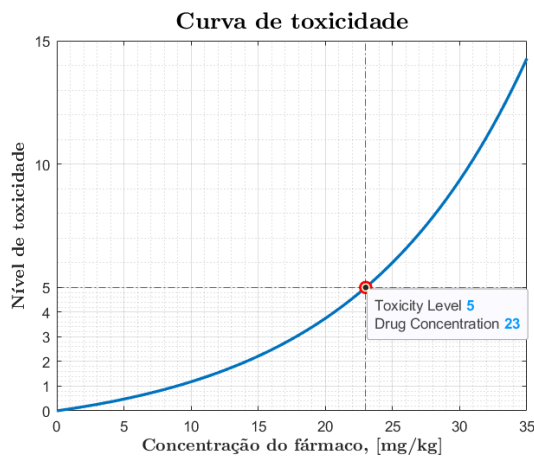


Fig. 4: Níveis de toxicidade para o fármaco Atezolizumab. A marca representa a concentração para qual o nível de toxicidade é máximo (*grade 5*).

Como explicitado na Fig. 2, a equação de Hill introduz uma saturação na variação da concentração do fármaco.

Tal traduz-se em concentrações baixas, resultarem em efeitos bastante diminutos; e concentrações elevadas, tenderem para um efeito saturado, i.e., **★ administrações com dosagens mais elevadas do que um certo patamar, não produzem um maior efeito na redução do tumor.**

Para além disto, há que ter em consideração a carga tóxica a que o organismo é exposto na terapia, o que torna a dosagem num parâmetro de fulcral controlo, proeminentemente com fármacos de elevada toxicidade. Acrescenta-se:

No entanto, os níveis de toxicidade não podem ser explicitamente aferidos⁵ e não existem modelos para esta avaliação[1].

Ao estudar a concentração de um fármaco no organismo durante uma terapia, é possível estimar os níveis de toxicidade “*by using a function yielding a certain small value until a certain amount of concentration is achieved. After this threshold, the function grows exponentially*”[4].”[1] A curva de toxicidade foi escolhida de modo a que a *morte*⁵ seja atingida quando a concentração do fármaco no organismo excede por 15% o maior valor de dose permissível⁶.

P3 | Modelo de crescimento do tumor

a) Pontos de equilíbrio (para $u = 0$)

No equilíbrio, $V(t)$ é constante, e consequentemente, a primeira derivada é nula.

$$\begin{cases} \dot{V}(t) = 0 \\ u = 0 \end{cases} \implies aV \left(1 - \frac{V}{K_T} \right) = 0 \implies V = 0 \vee V = K_T = 10 \text{ mm}^3$$

⁴“The semi-log plot is the preferred method for plotting concentration-response relationships because it becomes easier to accurately determine the EC50 value (...) by placing it on a linear portion (...)”[5]

⁵Não obstante, o *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) permite classificar a toxicidade em ensaios clínicos como:

→ leve (*grade 1*), moderada (*grade 2*), severa (*grade 3*), risco de morte (*grade 4*) e morte (*grade 5*).

⁶Para o fármaco Atezolizumab → 20 mg/kg[6].

b) Análise da monotonia da variável V (para $u = 0$)

Monotonia da dinâmica de crescimento do tumor

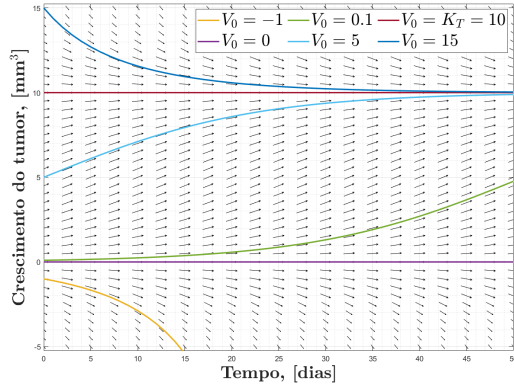





Fig. 5: Evolução do volume do tumor para diferentes valores iniciais.

Tab. 1: Tabela de monotonia do crescimento do tumor $V(t)$ para $u = 0$.

$V(t)$	$-\infty$	0	K_T	$+\infty$			
$\dot{V}(t)$	$-$	$-$	0	$+$	0	$-$	$-$
$V(t)$		eq_{min}		eq_{max}			

\therefore Monotonia de $V(t)$

\hookrightarrow **Decrescente:** $V \in]-\infty, 0[\cup]K_T, +\infty[$

\hookrightarrow **Crescente:** $V \in]0, K_T[$

Ao iniciar a simulação com um volume de $V_0 = 0$, não há crescimento, e o volume mantém-se em zero. Para um volume inicial de $0 < V(t_0) < K_T$, verifica-se então um crescimento; no entanto, é atingido um *plateau*, quando $V(t)$ se aproxima de K_T (*saturation level/carrying capacity*). Para $V_0 = K_T$, também não ocorre crescimento, e o volume permanece neste valor (vide a secção anterior). Finalmente, se começarmos com um volume superior a K_T , o volume decresce até eventualmente se encontrar na vizinhança da solução de equilíbrio assintoticamente estável.

Note-se que foi incluída uma secção de V 's negativos (apesar de não ter qualquer significado num contexto real), de modo a explicitar o comportamento "perto" de $V_0 = 0$ (solução de equilíbrio assintoticamente instável).

c) Poderá V assumir valores negativos mediante valores de $u \in [0; 1]$?

Seja $0 \leq u(t) \leq u_{max}$ e $V(t_0) > 0$. Tendo em conta a equação logística:

$$\dot{V}(t) = aV \left(1 - \frac{V}{K_T} \right) - buV = \left[a \left(1 - \frac{V}{K_T} \right) - bu \right] V = [a - bu]V - \left[\frac{a}{K_T} \right] V^2 \quad (3)$$

verifica-se que os pontos de equilíbrio passam a ser:

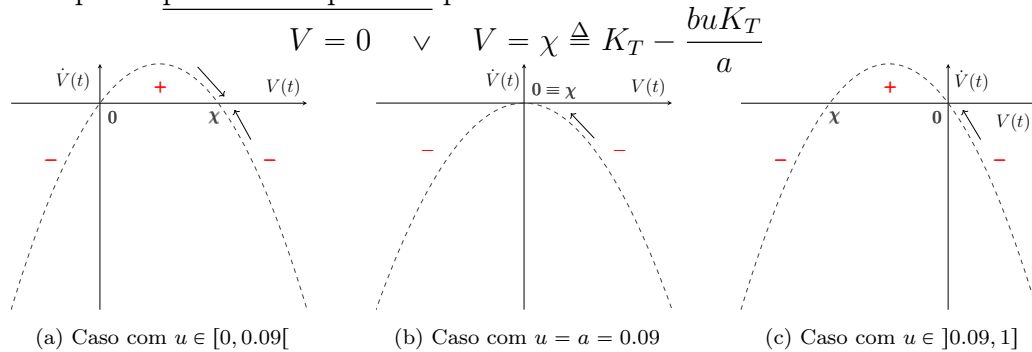


Fig. 6: Comportamento de \dot{V} em função de V . A **vermelho** encontra-se o sinal de \dot{V} que rege a monotonia de V (para o caso específico). O ponto de equilíbrio χ modifica-se consoante u . Este comportamento, modifica a estabilidade dos pontos de equilíbrio (vide os **vermelhos** da derivada para os casos distintos). Em (a) verifica-se um caso semelhante à alínea b), em que χ é o ponto de equilíbrio estável (i.e., $\forall V_0 > 0 : V \rightarrow \chi$). Para os casos explícitos em (b) e (c), dado que $V(t_0) > 0$, após a análise gráfica⁷ (e dos **vermelhos** de \dot{V}), trivialmente se conclui que as soluções tendem sempre para 0 (nunca o ultrapassando) para $u \in [0.09, 1]$.

⁷As setas representadas nas figuras explicitam o movimento intuitivo (consoante o **vermelho** da derivada) de V (somente para $V(t_0) > 0$, dada a relevância) em relação às soluções de equilíbrio assintóticas.

P4 | Simulação do sistema completo

a) Gráficos das variáveis relevantes

Pergunta 4

```

1  %% Function calls
2
3  % init concentration
4  c = concentration(); % same function as in P1
5
6  % init effect
7  u = Hill(c);
8  % init volume growth
9  v = Tumor(u);
10 % plot
11 PlotRelevantVariables(c, d, v, u);
12 %%
13 function v = Tumor(u)
14     %tumor growth variables
15     a = 0.09; b = 1; Kt=10; h = 1; p0 = 1; %mm^3
16     size = length(u);

```

(continuação)

```

17 %create logistic equation
18 l = @(v,u)a*v*(1-v./Kt) - b*u.*v;
19 %preallocating for speed
20 v = zeros(1,size); v(1) = p0; %← v0
21 %simple Euler's integration
22 for i = 1:(size - 1)
23     v(i+1) = v(i) + h*l(v(i),u(i));
24 end
25 end
26 %%
27 function u = Hill(c)
28     %half maximal effect
29     c50 = 7.1903;
30     %create Hill's equation: Pharmacodynamic model
31     u = c(2,:)./(c50 + c(2,:));
32 end

```

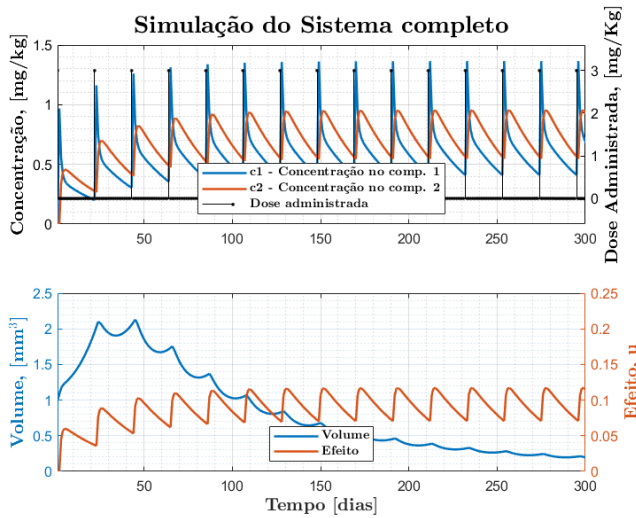


Fig. 7: Simulação do sistema completo.

Procedeu-se à simulação do sistema completo, considerando uma administração equiespaçada de período $T = 21$ d (utilizada em alíneas anteriores) mediante uma janela temporal de 300 dias. O tumor, após atingir 200% do volume inicial, é lentamente erradicado, aparente na diminuição de volume com a constante administração do fármaco.

A característica ondulatória da evolução do volume do tumor deve-se à presença reduzida do fármaco no organismo, consequência da dosagem de 3 mg/kg.

b) Otimização do espaçamento entre aplicações do fármaco

Pergunta 4 - Aquisição do espaçamento

```

1 function T = Optimal()
2 %declare requerimen
3 opVolume = 0.10; N = 25; d = zeros(1,N) + 3;
4
5 for T = 1:21
6     clear dosage; dosage = upsample(d,T);
7
8     % Calculate volume evolution
9     c = concentration(dosage);
10    u = Hill(c);
11    v = Tumor(u);
12
13    % evaluate volume at 25 day mark
14    if v(25) >= opVolume
15        break
16    end
17
18 end
19 fprintf(Optimal periodicity: %i days\n, T);
20
21 end

```

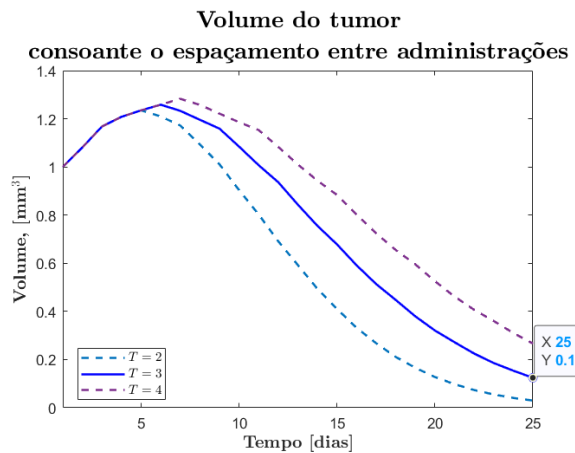
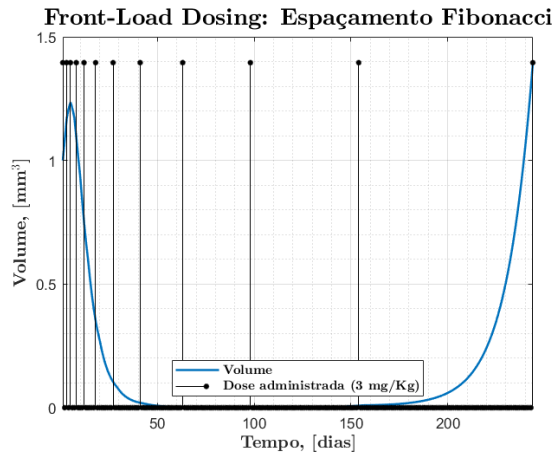


Fig. 8: Evolução do volume do tumor consoante 3 espaçamentos adjacentes. A azul verifica-se a curva com o valor ótimo para solucionar os requerimentos.

P5 | Espaçamento variável entre as tomas de medicamento

O espaçamento variável depende do objetivo do modelo de tratamento proposto, nomeadamente, **erradicação** ou **supressão** do tumor:

→ *Front-Load dosing*



“Dosing by “front-loading” has thus become the mainstay of treatment, owing largely to theoretical and laboratory studies over the past 40 years (...)”[7]

Front-Loading → Administração de doses elevadas de fármaco mediante espaçamentos de curta duração na fase inicial de terapia.

Fig. 9: Simulação da administração *Front-Load* mediante a sequência de Fibonacci.

A administração *Front-Load* procura erradicar o tumor nos estágios iniciais de desenvolvimento, evitando aquisições elevadas de resistência (vide secção P6). A simulação evidencia uma rápida diminuição do volume cancerígeno com aproximação do limite assintótico em $V = 0$ na marca dos 50 dias e ainda um baixo crescimento máximo de 23% do volume inicial (50.º dia).

Em contexto real, esta impressionante diminuição de volume⁷ revela-se inconsistente: a remissão é muitas vezes seguida de reincidência (de forma análoga ao crescimento na marca dos 150 dias, na Fig. 9)⁸. Esta administração apresenta alguns pontos pouco favoráveis:

1. Aplicação de uma elevada dose de fármaco num curto espaço de tempo leva a um incremento da carga tóxica no corpo hospedeiro (vide secção P2).
2. Dificuldade em limitar a ação do fármaco ao tumor: *“threat to the bone marrow and other at-risk stem cell compartments.”*[7]
3. Eficácia reduzida em massas cancerígenas heterogêneas (*“The cell population subject to treatment is in general not uniform, consisting instead of sensitive and resistant subpopulations.”*)

→ *Metronomic dosing*

“Recently, a revolutionary form of chemotherapy has emerged. Metronomic chemotherapy (...)”[8]

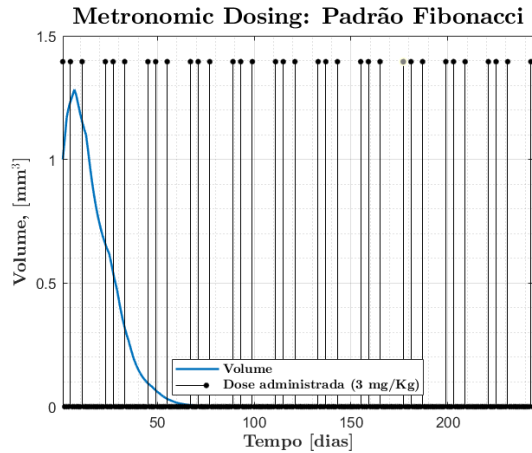
A administração metronómica depende de uma administração continua e periódica de baixa dosagem (*minimum biologically effective dose*[8]) e consequentemente de baixa toxicidade, sem períodos de pausa entre fases de administração (*no prolonged drug-free breaks*[8]). Esta administração não procura erradicar mas sim suprimir o tumor: *“Patient survival is not incompatible with tumor presence.”*[7].

Este modelo de espaçamento preenche as lacunas do anterior:

1. Aplicação de baixas doses de fármaco, que por consequência, não excedem a dose permissível deste no organismo (secção P2).
2. Permite a restauração de células essenciais (“*stemcell recovery*”[7]).
3. Limita a proliferação de células resistentes através da manutenção de uma elevada proporção de células sensíveis no seio do tumor: “*due to competition for space and resources between these populations (...)*”[8] → *Resensitization effect*[7].

★ São considerados dois casos de espaçamento metronómico:

i) *Pattern*

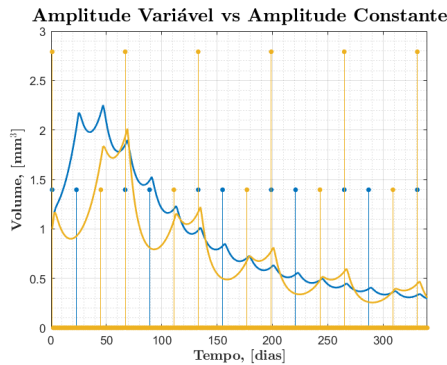


“A general chemotherapeutic dosing regimen involves delivering a fixed pattern of equal doses, separated by “rest periods” to allow stemcell recovery.”[7]

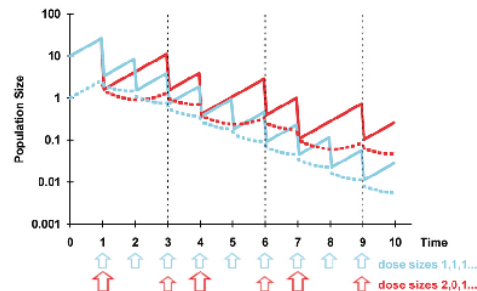
A administração metronómica cíclica (*metronomic pattern dosing*) evidencia uma regressão de volume tumoral menos célere que a observada no espaçamento *Front-Load*, mantendo, no entanto, um baixo volume de forma contínua ao longo do tempo.

Fig. 10: Sim. da administração mediante o 5º e 6º elemento da sequência, com *rest period* = 10d.

ii) *Response to uneven vs. metronomic dosing*



(a) Dose constante = 3 mg/kg a azul; dose variável = 6 mg/kg, 0, 3 mg/kg periódicos a amarelo.



(b) Dose constante = 1 mg/kg a azul; dose variável = 2 mg/kg, 0, 1 mg/kg periódicos a vermelho.

Fig. 11: Comparação entre espaçamentos constantes de dose variável e dose e permanente

Tomando a abordagem metronómica como vetor de ataque preferível face à *Front-Load dosing*, podemos ainda recorrer à comparação de uma administração equiespaçada no tempo de amplitude variável e metronómica de amplitude constante:

→ “Although the more up-front [amplitude variável] schedule is competitive early on, metronomic delivery provides better long-term suppression”[7] comprovada pela estabilidade da diminuição de volume Fig. 11 (b) a amplitudes constante e corroborada pela evolução observada na Fig. 11 (a).

Nota → Vale salientar as regressões a pontilhado na Fig. 11 representantes da evolução das células resistentes. É corroborado (através de simulações) o mencionado na secção anterior: **o espaçamento metronómico controla o aumento de células resistentes.**

⁷Comparativamente à administração abordada na secção 4 a)

⁸Embora o recrescimento do tumor na simulação seja resultado da limitação da equação logística (vide secção P3 c)), podemos admitir esta reincidência perto da realidade.

P6 | Desenvolvimento de resistência nas células cancerígenas

O processo de modelação do desenvolvimento de resistência nas células cancerígenas é de natureza não trivial. A resistência adquirida afeta, mediante vários vetores de ataque, o modelo farmacodinâmico (*drug-concentration response*), e é inerentemente dependente do corpo hospedeiro:

“Resistance to therapy results from host factors, such as poor absorption or rapid metabolism, or epigenetic alterations in the cancer cells.”[1]

Consequentemente, desenvolveram-se dois modelos baseados na interação *drug-receptor*, de nomes "**Antagónico Competitivo**" e "**Antagónico Não Competitivo**", cuja descrição é sucintamente inframencionada:

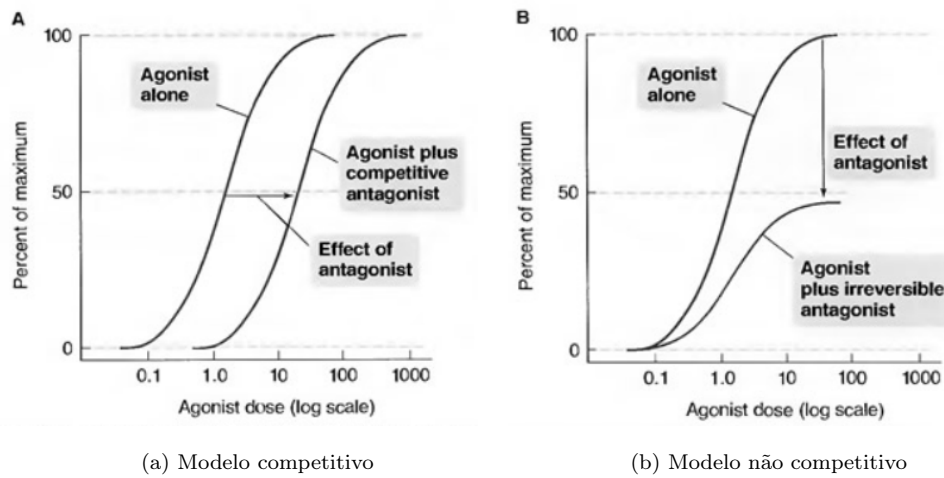


Fig. 12: *Drug concentration-response* com efeito antagónico[9].

A | Modelo Competitivo: A resistência compete com a ação do fármaco no recetor. O aumento de administração de fármaco detém o efeito da resistência (*“(...) can be overcome by increasing the dose of the agonist [fármaco].”*[9])

↳ **Efeito** → A curva *drug-concentration response* sofre um desvio para a direita, mediante o incremento do parâmetro C_{50} .⁹

$$\text{Modelo de efeito (2) adaptado} \rightarrow u \triangleq \frac{C_p(t)}{(1 + r(t)) \cdot C_{50} + C_p(t)} \quad (4)$$

B | Modelo não Competitivo: A resistência inibe a ação do fármaco no recetor.

↳ **Efeito** → O efeito do fármaco é progressivamente menor, a curva de *drug-concentration response* sofre um *shrink*, *“The actions of a non-competitive antagonist cannot be overcome by increasing the dose (...)”*. [9]

$$\text{Modelo de efeito (2) adaptado} \rightarrow u \triangleq \frac{1}{1 + r(t)} \cdot \frac{C_p(t)}{C_{50} + C_p(t)} \quad (5)$$

O modelo da resistência, $r(t)$, procura representar o efeito que baixas concentrações de fármaco induzem nas mutações das células cancerígenas. O modelo desenvolvido, bem como a sua representação gráfica encontram-se abaixo:

⁹*“Acquired resistance can be incorporated in the model by increasing the C_{50} parameter from PD (...), since it will directly decrease the drug effect.”*[1]

Exemplo do Período de Aquisição de Resistência

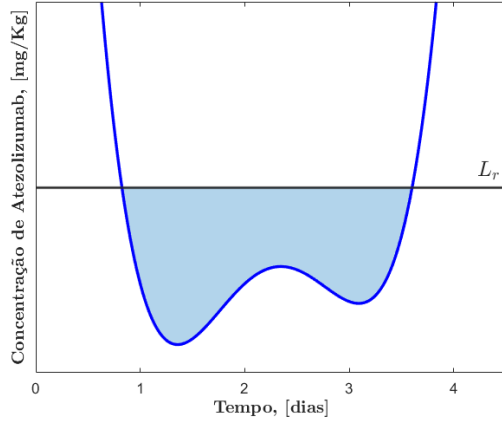
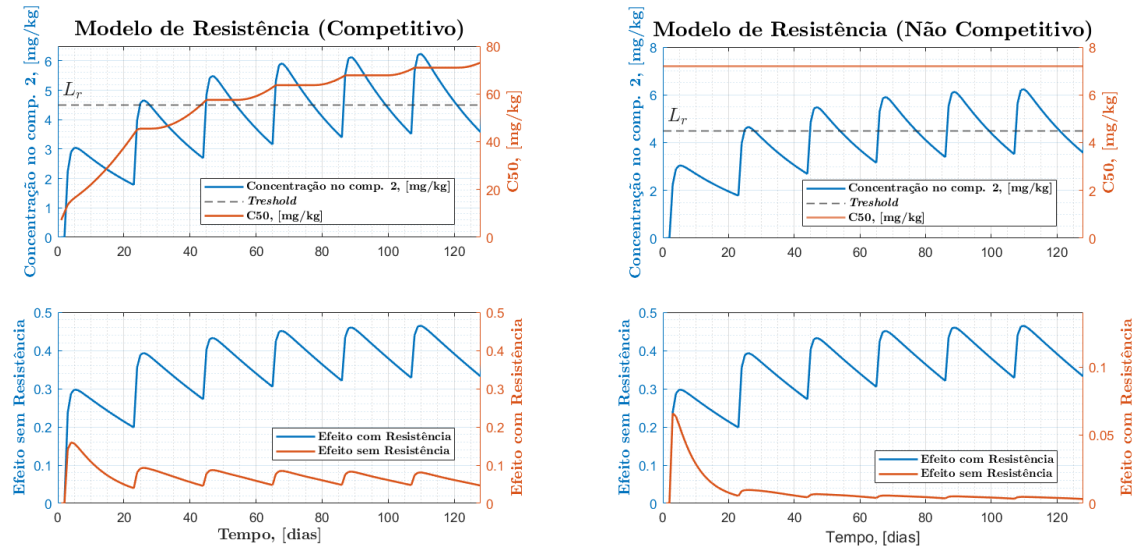


Fig. 13: Representação gráfica da área de desenvolvimento de resistência, a azul. A curva a azul escuro representa uma curva de concentração.

$$\rightarrow \begin{cases} r(t) = K_r \cdot \int_0^t \max[0, L_r - C_p(\tau)] d\tau \\ \dot{r}(t) = K_r \cdot \max[0, L_r - C_p(t)] \end{cases}$$

Onde K_r é o coeficiente de capacidade de mutação do tumor[4] e a resistência é apenas desenvolvida abaixo de uma linha de *Threshold*, L_r onde “(...) the driving tolerance is directly proportional to the intensities of past exposures (...)”[10] \rightarrow cálculo da área de concentração abaixo do limite de *Threshold*.

A simulação dos modelos foi realizada mediante um exemplo de terapia real de nome *Intravenous (IV) Bolus Therapy*¹⁰[1]:



(a) Modelo de resistência antagonista competitiva.

(b) Modelo de resistência antagonista não competitiva.

Fig. 14: Concentração no compartimento de efeito (C_p), evolução do parâmetro C_{50} e comparação dos efeitos sem resistência e com resistência para ambos os modelos para a terapia de parâmetros.

(a) \rightarrow Para o modelo competitivo o parâmetro C_{50} incrementa apenas quando a concentração no compartimento de efeito é inferior à linha de *Threshold* (a integração em $r(t)$ é apenas realizada quando esta condição se verifica), de notar o **caráter oscilatório da regressão** (correspondente a iterações de incremento e estabilidade). O efeito possui uma **redução significativa** relativamente ao efeito não limitado pela resistência adquirida (consequência dos sucessivos desvios da curva de Hill).

(b) \rightarrow Para o modelo não competitivo realça-se a **mitigação acentuada do efeito do fármaco**, quando comparado ao modelo anterior, coerente com o já discutido acima: Este modelo inibe o efeito, esta inibição não é solúvel por meio de incremento de concentração (a curva de *drug-concentration response*, sofre **constrangimentos sucessivos**, aproximando-se da nulidade).

¹⁰ $T = 21d$, dose = 20 mg/kg, para $K_r = 0.1$ e $Threshold = 4.5$

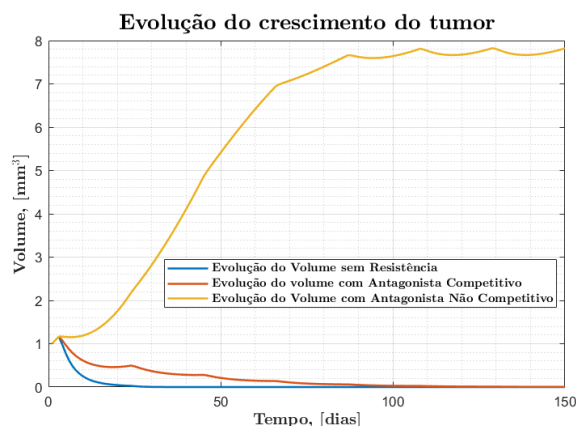


Fig. 15: Comparação das 3 evoluções do tumor mediante o modelo de resistência projetado.

Supondo agora um *Threshold* de 3.5, para o qual a concentração no compartimento de efeito é continuamente superior¹¹ (após algumas iterações de administração), duas conclusões são aparentes:

→ A evolução do volume afetado pelo modelo antagonista competitivo é análoga à evolução não afetada, possuindo apenas uma janela temporal mais alargada. Tal seria esperado: a resistência afeta a posição da curva de resposta do fármaco, mas não o seu u_{max} , **★ a diminuição de volume é mais tardia.**

→ A evolução do volume afetado pelo modelo antagonista não competitivo atinge um ponto de equilíbrio, já discutido secção P3. Tal seria esperado: a resistência afeta o u_{max} da curva de resposta do fármaco, o seu efeito é sucessivamente e irreversivelmente menor. **★ Para mitigar este efeito seria necessário ser mais veloz que o desenvolvimento de resistência, o que equaciona em administrações iniciais de fármaco mais elevadas.**

Referências

- [1] Francisco M. F. Teles. Cancer Therapy Optimization based on Unsupervised Learning and Multiple Model Adaptive Control. Master's thesis, Instituto Superior Técnico, November 2017.
- [2] S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, Xavier Barbaut, L. Bourguignon, Michel Ducher, and P. Maire. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 22(6):633–648, December 2008.
- [3] João P. L. S. Belfo. Optimal Impulsive Control for Cancer Therapy. Master's thesis, Instituto Superior Técnico, October 2018.
- [4] J. M. Lemos, J. V. Pinheiro, and S. Vinga. A nonlinear MPC approach to minimize toxicity in HIV-1 infection multi-drug therapy. *10th Portuguese Conference on Automatic Control*, pages 315–320, July 2012. CONTROLO'2012.
- [5] Mohammed Saji Salahudeen and Prasad S Nishtala. An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharm. J.*, 25(2):165–175, February 2017.
- [6] BLA761034, Clinical Pharmacology Review: TECENTRIQ™ (Atezolizumab), 2016. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/761034Orig1s000ClinPharmR.pdf. [2022-12-10].
- [7] Philip Hahnfeldt, Judah Folkman, and Lynn Hlatky. Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *J. Theor. Biol.*, 220(4): 545–554, February 2003.
- [8] Elisa S. M. Pacheco. Cancer therapies based on Optimal Control methods. Master's thesis, Instituto Superior Técnico, December 2017.
- [9] DG Lambert. Drugs and receptors. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 4 (6):181–184, 12 2004. ISSN 1743-1816. doi: 10.1093/bjaccp/mkh049.
- [10] H. C. Porchet, N. L. Benowitz, and L. B. Sheiner. Pharmacodynamic model of tolerance: application to nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244(1):231–236, January 1988.
- [11] M. Braun. *Differential Equations and Their Applications*. Springer, 1993.

¹¹O *Threshold* previamente escolhido verificava-se sempre superior à concentração no compartimento de efeito de forma a demonstrar a evolução da atuação do fármaco. Em contexto real, supomos que a concentração de fármaco no corpo, após algumas administrações, consiga superar a criação de resistência.