



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
FACULDADE DE FARMÁCIA (FF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

LARA BARROSO BRITO PRADO

Os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish como modelo alternativo para predizer a toxicidade oral aguda *in vivo*

GOIÂNIA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Lara Barroso Brito Prado

3. Título do trabalho

Os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish como modelo alternativo para prever a toxicidade oral aguda in vivo

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **LARA BARROSO BRITO PRADO, Usuário Externo**, em 06/07/2022, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Gisele Augusto Rodrigues De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/07/2022, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento



no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2090608** e o código CRC **419AB6E9**.

LARA BARROSO BRITO PRADO

Os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish como modelo alternativo para predizer a toxicidade oral aguda *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Goiás (UFG) para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos
Linha de Pesquisa: Toxicologia

Orientadora: Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira
Co-orientadora: Dra. Marize Campos Valadares

GOIÂNIA
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Prado, Lara Barroso Brito

Os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish como modelo alternativo para predizer a toxicidade oral aguda in vivo [manuscrito] / Lara Barroso Brito Prado. - 2021. xviii, 73 f.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira; co orientadora Dra. Marize Campos Valadares.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Zebrafish. 2. Toxicidade oral aguda. 3. DL50. 4. Sistema Global de Harmonização. 5. QAAR. I. de Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº 44 da sessão de Defesa de Tese de **Lara Barroso Brito Prado**, estudante de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração **Fármacos e Medicamentos**.

Aos onze dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e um, a partir das 14:00 horas, no Google Meet, realizou-se a sessão pública de defesa de tese de doutorado intitulada "Os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish como modelo alternativo para prever a toxicidade oral aguda in vivo". Os trabalhos foram instalados pela Co-orientadora, Professora Doutora Marize Campos Valadares FF/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Matheus Lavorenti Rocha - FF/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, Doutora Monica Valdyrce Dos Anjos Lopes Ferreira - Instituto Butantan -cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, Professora Doutora Danielle Palma de Oliveira - USP, e Doutor Vinícius de Medeiros Alves - National Institute of Environmental Health Sciences. Após a arguição da candidata, a Banca Examinadora se reuniu em sessão secreta, a fim de concluir o julgamento da tese em andamento, tendo sido a candidata aprovada em sua defesa de tese. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Marize Campos Valadares FF/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos onze dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Marize Campos Valadares, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2021, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Lavorenti Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2021, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinícius de Medeiros Alves, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Danielle Palma de Oliveira, Usuário Externo**, em 12/02/2021, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1861134** e o código CRC **1E12E694**.

Referência: Processo nº 23070.006562/2021-71

SEI nº 1861134



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

**Goiânia-GO
2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Lara Barroso Brito Prado

Orientador(a): Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Co-Orientador(a): Dra. Marize Campos Valadares

Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira / Presidente

Professora Adjunta II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Dra. Danielle Palma de Oliveira / Membro Titular

Professora Associado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberião Preto da
Universidade de São Paulo, FCFRP/USP

Dr. Matheus Lavorenti Rocha / Membro Titular

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG

Dra. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira / Membro Titular

Pesquisadora no Laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

Dr. Vinicius de Medeiros Alves / Membro Titular

Pesquisador no National Institute of Environmental Health Sciences.

Dra. Carolina Horta Andrade/ Membro Suplente

Professora Adjunto II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Dra. Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino / Membro Suplente

Professora Adjunto II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense,
FF/UFF.

Data: 11/02/2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha orientadora, Dra. Gisele, pelos ensinamentos compartilhados durante a pós-graduação, pela dedicação, paciência, amizade, carinho e empatia durante toda essa jornada.

Agradeço também minha co-orientadora, Dra. Marize, por ter aberto as portas do mundo acadêmico quando eu ainda estava na graduação e naquele momento ter confiado no meu potencial para seguir nesse caminho, por sempre ter apoiado esse projeto, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

Aos amigos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho seja na bancada ou no café compartilhado, Gessyca Gonçalves, Laís de Brito, Artur Christian, Larissa Cleres, Thaís Rosa e Tatyane Hayasaki, agradeço profundamente.

Agradeço também aos colegas de bancada do Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental e do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia In Vitro pelo apoio, troca de conhecimento de sempre e pelo incentivo diário.

Ao Prof. Dr. Bruno Júnior Neves (LabMol), pelo apoio, pela disponibilidade em ajudar e pelos conhecimentos compartilhados e ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti (LQFM) pelo fornecimento do candidato à fármaco para aplicação neste trabalho.

À Fernanda Belatto, secretária da Pós-graduação, pela ajuda, carinho, profissionalismo, competência e amizade, meus sinceros agradecimentos.

Em especial agradeço à minha família. Ao meu marido Cristiano Prado pelo amor, companheirismo, apoio e compreensão. Meus pais, Nordman Brito e Jadivan Barroso, pelo amor incondicional e por toda dedicação em me tornar quem eu sou e na minha formação profissional, vocês são meus maiores exemplos. Meus irmãos Nordman Junior e Pedro Henrique por sempre me mostrarem uma forma mais leve de viver. À minha cunhada, Aira Mori, pelo exemplo de mulher, mãe, farmacêutica e amiga e por me permitir ser tia e madrinha dos meus sobrinhos, João Mori Brito e Igor Mori Brito, que são minha maior alegria, meu melhor refúgio e os melhores presentes que a vida me deu.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás e em especial à Faculdade de Farmácia, os docentes e os funcionários administrativos da instituição pelo espaço, acolhimento e colaboração durante minha formação.

À FAPEG, ao CNPq, CAPES e INCT-DATREM pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

	SUMÁRIO	vi
	LISTA DE TABELAS	viii
	LISTA DE FIGURAS	ix
	SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiii
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	O uso de animais na avaliação da toxicidade	3
2.2	Avanços no teste de toxicidade oral aguda <i>in vivo</i>	6
2.3	Métodos alternativos ao uso de animais na avaliação de toxicidade de novas substâncias	11
2.3.1	O estágio embrio-larval de zebrafish como modelo preditivo na avaliação da toxicidade	15
3	OBJETIVOS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Materiais	23
4.1.1	Substâncias	23
4.1.2	Preparo das soluções	25
4.2	Coleta dos dados da dose média letal (DL ₅₀) em roedores	26
4.3	Métodos	26
4.3.1	Teste de toxicidade aguda com embrião de peixe (FET) utilizando zebrafish (<i>D. rerio</i>)	26
4.3.1.1	<i>Manutenção dos peixes adultos</i>	26
4.3.1.2	<i>Obtenção dos ovos</i>	28
4.3.1.3	<i>Teste de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish (D. rerio)</i>	28
4.3.1.4	<i>Análise estatística</i>	30
4.3.2	Relação Quantitativa Atividade-Atividade	30
4.3.2.1	<i>Curadoria dos dados</i>	30
4.3.2.2	<i>Seleção do descritor</i>	31
4.3.2.3	<i>Modelagem QAAR</i>	31
4.3.2.4.	<i>Validação Estatística</i>	32
4.3.2.5.	<i>Implementação do modelo</i>	32

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1.	Correlação dos efeitos letais para o estágio embrio-larval de zebrafish (CL ₅₀) e os dados em roedores (DL ₅₀) para estimar a toxicidade oral aguda <i>in vivo</i>	33
5.1.1.	Avaliação do domínio de aplicação do modelo pré-clínico utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish para estimar a toxicidade oral aguda	36
5.2.	Análises dos efeitos subletais para o estágio embrio-larval de zebrafish como um parâmetro complementar para predizer a toxicidade oral aguda <i>in vivo</i>	38
5.3.	Avaliação da aplicabilidade do modelo de regressão linear, utilizando um protótipo a fármaco, LQFM 021	42
5.4.	Modelos de QAAR gerados para predizer a toxicidade oral aguda <i>in vivo</i>	44
6	CONCLUSÃO	48
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	56
	APÊNDICES	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste toxicológicos pré-clínicos harmonizados para avaliação da segurança e suas principais características	08
Tabela 2. Valores da dose média letal (DL ₅₀) e os critérios para categorias de toxicidade oral aguda <i>in vivo</i> .	11
Tabela 3. Métodos alternativos ao uso de animais em atividade de pesquisa no Brasil, reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).	13
Tabela 4. Comparação do desenvolvimento nos estágios iniciais da vida do zebrafish, ratos e humanos.	20
Tabela 5. Substâncias selecionadas para a avaliação da toxicidade aguda utilizando embriões e larvas de zebrafish, as fórmulas estruturais, as categorias de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS) e a faixa de concentração utilizada para avaliação da substância utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish.	24
Tabela 6. Valores estimados da dose média letal (DL ₅₀) em roedores.	26
Tabela 7. Valores da concentração média letal (CL ₅₀) das substâncias após 96 h de exposição ao estágio embrio-larval de zebrafish e seu intervalo de confiança (IC).	33
Tabela 8. Valores estimados de dose média letal (DL ₅₀) e a categorização das substâncias estimada a partir dos valores de concentração média letal (CL ₅₀) obtidos no ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish, após 96 h de exposição, utilizando o modelo pré-clínico para estimar a toxicidade oral aguda.	36
Tabela 9. Malformações observadas no desenvolvimento embrionário dos estágios iniciais de zebrafish expostos às substâncias durante 96 h.	38
Tabela 10. Valores estimados da concentração média de efeito (CE ₅₀) em miligrama por litro (mg/L) dos efeitos subletais nos estágios embrio-larvais de zebrafish após 96 h de exposição às substâncias.	41
Tabela 11. Valores estimados da concentração média letal (CL ₅₀) do candidato a fármaco LQFM 021, obtidos após 96 h de exposição ao estágio embrio-larval de zebrafish e seu intervalo de confiança (IC).	43
Tabela 12. Valores estimados da concentração média de efeito (CE ₅₀) dos efeitos subletais em larvas de zebrafish após 96 h de exposição ao LQFM 021 e seu intervalo de confiança (IC).	44
Tabela 13. Desempenho externo dos modelos QAAR desenvolvidos para prever a toxicidade oral em ratos.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cronologia dos acontecimentos significativos quanto ao uso de animais na avaliação da toxicidade durante o século XX.	06
Figura 2. Imagem de posição lateral do zebrafish (<i>Danio rerio</i>) evidenciando seu tamanho, coloração e nadadeiras.	15
Figura 3. Ciclo de vida do zebrafish (<i>Danio rerio</i>).	19
Figura 4. Estrutura química do protótipo a fármaco, LQFM021.	25
Figura 5. (A) Hack de recirculação utilizada para manutenção dos peixes adultos de zebrafish e obtenção dos embriões. (B) Painel de monitoramento da hack para controle dos parâmetros pH, temperatura e condutividade. (C) Criadeiras utilizadas para obtenção dos ovos de zebrafish.	27
Figura 6. Modelo do delineamento experimental para os ensaios definitivos do teste de toxicidade aguda com embrião de peixe (FET) utilizando zebrafish (<i>D. rerio</i>), em placas de 24 poços. CN: Controle negativo; Cx: Concentrações das substâncias; CS: Controle de solvente; CP: Controle positivo; CI: Controle interno.	29
Figura 7. Correlação entre os valores na escala logarítmica da concentração média letal (CL ₅₀) obtidos a partir do ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish e os valores na escala logarítmica da dose média letal (DL ₅₀) provenientes da literatura obtidos da toxicidade oral aguda em ratos. Foram avaliadas 15 substâncias: (1) Cloreto de Mercúrio II, (2) Cicloheximida, (3) Cloreto de Cádmio II, (4) Diclorvos, (5) Propranolol, (6) Verapamil, (7) Sulfato de Tálcio I, (8) Ácido Acetilsalicílico, (9) Acetaminofeno, (10) Oxalato de Sódio, (11) Sulfato de Atropina, (12) Glicerol, (13) Etanol, (14) Cloreto de Sódio e (15) Álcool Isopropílico.	34
Figura 8. Frequência das diferentes categorias de toxicidade oral aguda, de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS), determinado a partir dos valores estimados na escala logarítmica da dose média letal (DL ₅₀) utilizando o modelo pré-clínico utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish para estimar a toxicidade oral aguda. Barras representam média ± SEM.	37
Figura 9. Fotomicroscopia representativa das principais malformações identificadas nos estágios embrio-larvais de zebrafish após 96 h de exposição à diferente substâncias: (A) Controle Negativo (2x); (B) Diclorvos 25 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta), edema de pericárdio (seta vermelha) e má absorção de saco vitelínico (seta azul); (C) Cloreto de Mercúrio II 0,125 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta), edema de pericárdio (seta vermelha) e má absorção de saco vitelínico (seta azul); (D) Controle Negativo (2x); (E) Cicloheximida 5 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta), edema de saco vitelínico (seta cinza) e má absorção de saco vitelínico (seta azul); (F) Propranolol 25 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta) e má absorção de saco vitelínico (seta azul).	39
Figura 10. Frequência de distribuição das malformações mais persistentes nas diferentes categorias de toxicidade oral aguda, de acordo com o Sistema	40

Global de Harmonização (GHS), utilizando o estágio embrio-larval de zebrafish.

Figura 11. Frequência de distribuição das malformações nos estágios embrio-larvais de zebrafish, considerando os valores na escala logarítmica da concentração média de efeito (CE_{50}), nas diferentes categorias de toxicidade oral aguda, de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS). 42

Figura 12. Matriz de correlação entre os descritores toxicológicos (efeitos letais e subletais) e a variável dependente (pDL_{50}). O valor de medida varia de -1 (correlação negativa forte) a 1 (correlação positiva forte). Um valor de 0 representa nenhuma correlação linear. *valor de $p < 0,001$. A análise estatística foi realizada por meio do teste qui quadrado de Pearson na matriz do descritor de contingência. 45

Figura 13. Gráfico de dispersão dos valores de pDL_{50} observados vs. Preditos para as substâncias do conjunto teste. (a) Modelo de regressão linear simples utilizando a variável independente pCL_{50-96h} e (b) Modelo *Random Forest* utilizando as variáveis independentes pCL_{50-96h} , atraso na eclosão, edema de saco vitelino, falta de equilíbrio, má absorção de saco vitelino, pigmentação corporal e categoria GHS zebrafish. 47

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
±	Mais-menos
®	Marca registrada
a.C	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CI	Controle interno da placa
CL ₅₀	Concentração média letal
CN	Controle negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Controle positivo
CS	Controle de solvente
d.C	Depois de Cristo
DL ₅₀	Dose média letal
DNEL	Nível derivado sem efeito (do inglês, <i>Derived No-Effect Level</i>)
dpf	Dias pós fertilização
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês, <i>Environmental protection agency</i>)
ETA	Estimativa de toxicidade aguda
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Agência americana de Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
FF	Faculdade de farmácia
FQ	Faculdade de Química
FRAME	Fundo de Substituição de Animais em Experiências Médicas (do inglês, <i>Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments</i>)
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos (do inglês, <i>Globally Harmonized System</i>)
h	Hora
hpf	Horas pós fertilização
LOAEL	Menor nível de efeito adverso observado (do inglês, <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>)
log	Logaritmo
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/L	Miligrama por litro
mm	Milímetro
NOAEL	Nível de nenhum efeito adverso observável (do inglês, <i>No Observed Adverse Effect Level</i>)
nº	Número
OECD	Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, <i>Organisation for the Economic Co-operation and Development Test Guideline</i>)
ppt	Partes por mil
RDC	Resolução do Conselho de Administração Colegiado
ToxIn	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia <i>in vitro</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
µm	Micrometro

Os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish como modelo alternativo para prever a toxicidade oral aguda *in vivo*

Brito L.A.^{1,2}, Valadares M.C.², Oliveira, G.A.R.¹

¹Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental (EnvTox), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

²Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro* (ToxIn), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

O estágio embrio-larval de zebrafish (*Danio rerio*) oferece um sistema complexo e multicelular que integra vários tecidos e processos de diferenciação. Além disso, os embriões de zebrafish são estrutural e funcionalmente semelhantes aos vertebrados, incluindo os humanos. O teste de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish já é uma abordagem alternativa reconhecida mundialmente para a avaliação ecotoxicológica, porém não está incluído nas normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), as quais reconhecem o uso de métodos alternativos em atividades de pesquisa validados no Brasil. Considerando que este modelo pode preencher a lacuna entre os testes convencionais *in vitro* e *in vivo* para extrapolação de dados para humanos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda de substâncias com diferentes categorias no Sistema Global de Harmonização (GHS), usando o estágio embrio-larval de zebrafish para determinar os valores de CL₅₀ e compará-los com dados *in vivo* (DL₅₀) da literatura, a fim de gerar um modelo alternativo para predição da toxicidade oral aguda em roedores. Este modelo de predição foi avaliado pela aplicação de um candidato a fármaco (LQFM 021). Para tanto, 15 substâncias foram avaliadas utilizando o *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) Test (OECD 236). Os parâmetros avaliados foram os efeitos letais e subletais de cada substância e do LQFM 021, após 96 h de exposição. Um modelo de regressão linear usando os valores na escala logarítmica de CL₅₀ e DL₅₀ foi gerado para a estimar a DL₅₀ a partir dos valores CL₅₀ do teste de toxicidade aguda com zebrafish. Este modelo resultou na seguinte equação: $\text{Log DL}_{50} \text{ (mg/kg)} = 0,5749 \times \text{log CL}_{50} \text{ (mg/L)} + 1,284$. O domínio de aplicação do método avaliado foi de 53,33% e o valor de R² foi de 0,66. Em relação aos efeitos subletais, as substâncias categorizadas como mais tóxicas no GHS foram as que apresentaram mais anormalidades no desenvolvimento. A DL₅₀ de predição do protótipo a fármaco LQFM 021, utilizando o teste FET, o qual é classificado como categoria 4 no GHS para toxicidade sistêmica oral aguda, foi de 408,52 mg/kg, ou seja, manteve-se classificado como categoria 4. Nesse trabalho também foi desenvolvido modelos de Relação Quantitativa Atividade-Atividade (QAAR), a partir dos dados obtidos no teste FET com zebrafish. Esse modelo utilizando sete descritores toxicológicos gerou modelos estatisticamente preditivos com valores de R² variando entre 0,80 a 0,95 e em combinação com o método *Random Forest* apresentou o melhor desempenho na predição toxicidade oral aguda *in vivo*. Portanto nossos resultados sugerem que os estágios embrio-larvais de zebrafish poderia ser pelo menos um refinamento no sentido dos princípios de 3R's para prever a toxicidade oral aguda *in vivo*, se apresentando como um intermediário na avaliação pré-clínica entre os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-Chave: Zebrafish, toxicidade oral aguda, DL₅₀, Sistema Global de Harmonização, QAAR

Zebrafish early-life stage as an alternative model to predict acute oral toxicity *in vivo***Brito L.A.^{1,2}, Valadares M.C.², Oliveira, G.A.R.¹**

¹Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Ambiental (EnvTox), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

²Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro* (ToxIn), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

Zebrafish (*Danio rerio*) early-life stages offer a complex and multicellular system integrating various tissues and differentiation processes. In addition, the zebrafish embryos are structurally and functionally similar to vertebrates, including humans. The acute toxicity test with zebrafish embryos and larvae is already worldwide recognized as an alternative model for ecotoxicological assessment, but it is not included in normative of the Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), which recognizes the use of alternative methods validated in research activities in Brazil. This organism model can fill the gap between conventional *in vitro* and *in vivo* tests for extrapolation of data for humans, the present study aimed to assess the acute toxicity of substances with different Global Harmonization System (GHS) categories using zebrafish early-life stage to determine LC₅₀ values and compared with *in vivo* (LD₅₀) acute oral toxicity data from literature, in order to generate a model to predict acute oral toxicity. This prediction model was evaluated by the application of a drug candidate (LQFM 021). Fifteen substances were evaluated by Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test (OECD 236). Parameter evaluated was lethal and sublethal effects after 96 h of exposure. A linear regression-model using the log-transformed of the LC₅₀ values and LD₅₀ was generated for the estimated of LD₅₀ from LC₅₀ values. This model resulted in the following equation $\text{Log LD}_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.5749 \times \text{log LC}_{50} \text{ (mg/L)} + 1.284$. The method domain of application was 53.33% and the R² was 0,66. Sublethal effects indicate that substances more toxic presented more abnormalities. The DL₅₀ predicted with FET testing LQFM 021, which classified as category 4 in GHS acute oral systemic toxicity assessment, was of 408.52 mg/kg, which also classified as Category 4. In this work, Quantitative Activity-Activity Relationship (QAAR) models were also developed, based on the data obtained in the FET test with zebrafish. This model using seven toxicological descriptors generated statistically predictive models with R² values ranging from 0.80 to 0.95 and in combination with the Random Forest method it presented the best performance in the prediction of acute oral toxicity *in vivo*. Therefore, our results suggest that early-life stages of zebrafish could be at least a refinement in the sense of the principles of the 3R's to predict acute oral toxicity *in vivo*, being as an intermediary in the preclinical evaluation between *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Zebrafish, acute oral toxicity, DL₅₀, alternative-testing methods, Global Harmonisation System, QAAR.

1 INTRODUÇÃO

A análise da segurança de substâncias químicas, medicamentos e cosméticos, vacinas e biofármacos, alimentos e aditivos alimentares é fundamental antes da comercialização para uso humano. O avanço da ciência e da tecnologia desencadeou em um desenvolvimento significativo na área de avaliação da toxicidade, por meio do aprimoramento de métodos convencionais e da aplicação de novas técnicas. A extrapolação de dados de toxicidade obtidos com modelos animais não é completamente segura para humanos, devido às variações na anatomia, fisiologia e bioquímica entre as espécies. No entanto, por razões éticas, esses produtos químicos devem ser testados em diferentes modelos animais (ensaios pré-clínicos) antes de serem submetidos a testes em humanos (ensaios clínicos) (Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018).

O processo de seleção das espécies, para os ensaios pré-clínicos *in vivo*, é efetuado em função das semelhanças existentes entre os humanos e os modelos animais, e normalmente, são utilizadas duas espécies distintas, uma de roedor (e.g., ratos, camundongos, porquinho-da-índia) e outra de não-roedor (e.g., coelhos, cães), obtendo-se assim informações sobre as semelhanças e diferenças em termos toxicocinéticos (Lavandeira, 2014). Essas espécies, roedores e não-roedores, são utilizadas na avaliação da toxicidade aguda pelo governo dos Estados Unidos, desde a década de 1950 (Ducharme et al., 2015).

A maioria das agências regulatórias no mundo exigem o teste de toxicidade aguda para rotulagem e classificação de substâncias para uso humano de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos (GHS), a fim de que os dados sejam harmonizados globalmente (Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018). Os produtos químicos podem ser alocados em uma das cinco categorias de toxicidade (Tabela 2) com base na toxicidade aguda pela via oral, dérmica ou inalatória de acordo com os critérios numéricos expressos como dose letal média (DL₅₀) aproximada (GHS, 2017). As substâncias com DL₅₀ abaixo de 5 mg/kg são classificadas como extremamente tóxicas, enquanto as substâncias com DL₅₀ acima de 5.000 mg/kg são consideradas relativamente inofensivas (não tóxicas) (Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018).

Considerando que, anualmente, até mil novos produtos químicos são introduzidos no mercado, houve um acúmulo de ensaios de toxicidade e, conseqüentemente, um número enorme de animais foram usados nessas avaliações. Assim, novos métodos de triagem são necessários para acompanhar o desenvolvimento de novos produtos

químicos a fim de reduzir o número de animais utilizados e proteger a saúde humana e ambiental (Ducharme et al., 2015; Brannen et al., 2016). Para a avaliação da toxicidade oral aguda, nesse contexto, métodos *in vitro* e *in silico* tem sido introduzidos na avaliação pré-clínica (Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018).

Nesse sentido, o estágio embrio-larval de zebrafish (*Danio rerio*) está emergindo como um desses modelos alternativos, uma vez que constitui uma ponte entre os testes com cultura de células (*in vitro*) e os testes *in vivo*, com roedores, por exemplo. O zebrafish não substitui os modelos de roedores, mas é complementar a eles, sendo particularmente útil em relação ao custo e na obtenção de análises rápidas e de alto rendimento, como por exemplo nos estágios iniciais (pré-regulatórios) de desenvolvimento de medicamentos, vacinas e cosméticos (Brannen et al., 2016).

Entre as características atrativas do modelo de embrião de zebrafish estão seu tamanho pequeno; desenvolvimento rápido, bem caracterizado e muito similar ao de outros vertebrados (incluindo os humanos); desenvolvimento embrionário externo e transparente protegido por um córion também transparente, o que permite o fácil monitoramento das mudanças morfológicas por estereomicroscopia. A organogênese dos órgãos principais é concluída em 5 dias após a fertilização (dpf). Além disso, destaca-se o baixo custo de manutenção dos animais, bem como a alta taxa de reprodução, o que o torna adequado para experimentos de alta performance (Kimmel et al., 1995; Lawrence, 2007; Scholz et al., 2008; Cassar et al., 2019). Vale ressaltar ainda que, muitas vias celulares e moleculares fundamentais envolvidas na resposta a produtos químicos ou ao estresse são conservadas entre o zebrafish e os mamíferos. O genoma completamente sequenciado do zebrafish, a similaridade genética a outras espécies de vertebrados (incluindo os humanos) também se destacam quanto à possíveis extrapolações (Ali, van Mil, Richardson, 2011; Garcia; Noves; Tanguay, 2016).

Dentro desse contexto, o objetivo geral do presente trabalho é investigar a toxicidade aguda de 15 substâncias com diferente categorização pelo GHS e determinar a correlação entre a concentração média letal (CL₅₀), proveniente do teste de toxicidade aguda com o estágio embrio-larval de zebrafish, e a DL₅₀ de dados da literatura com roedores. Essa análise de correlação da toxicidade oral aguda de roedores e zebrafish também irá considerar os dados de subletalidade, como um parâmetro complementar que acarreta a letalidade. Para tanto, esse modelo de predição da toxicidade oral aguda *in vivo* obtido com dados letais e subletais será aplicado a um protótipo a fármaco, o LQFM 021 (Martins et al. 2013).

2.1 O uso de animais na avaliação da toxicidade

O uso de animais na experimentação científica é praticado desde a antiguidade e os primeiros registros foram encontrados na Grécia antiga. Em torno de 500 a.C, Hipócrates relacionava o aspecto de órgãos humanos doentes com o de animais e, Alcmaeon realizava estudos de natureza anatomofisiológica. Aristóteles (384-322 a.C) também realizou estudos comparativos e observou semelhanças e diferenças na anatomia e fisiologia entre órgãos humanos e animais (Miziara et al., 2012). Galeno (130-210 d.C), em Roma, avaliou variáveis dos sistemas induzindo alterações orgânicas em animais e a partir desses experimentos relatou importantes características estruturais e fisiológicas dos vasos sanguíneos (Baeder et al., 2012).

Nos séculos seguintes, houve aumento na experimentação animal assistido por diferentes vieses ideológicos. Na idade média, com o advento da tradição judaica-cristã, proibiu-se a dissecação de cadáveres e os animais passaram a ser considerados seres desprovidos de alma, o que levou ao aumento do uso deles na experimentação. No Renascimento, surgiu o movimento do antropocentrismo, o qual consolidou a ideia de que todas as coisas existentes deveriam servir à espécie humana, o que sustentou a experimentação animal como método padrão de investigação científica (Guimarães; Freire; Menezes, 2016). Porém, o auge da experimentação animal só aconteceu no século XVII, quando o filósofo René Descartes (1596-1660) formulou a “teoria mecanicista”, na qual indicava que os animais eram considerados máquinas e desprovidos de sentimento e alma, portanto, incapazes de sentir dor. Desse modo, em 1638, William Harvey publicou um livro sobre a fisiologia da circulação com mais de 80 espécies diferentes de animais, resultados obtidos em estudos experimentais utilizando a dissecação de animais (Baeder et al., 2012; Guimarães; Freire; Menezes, 2016).

Posteriormente, em 1789, o filósofo Jeremy Bentham contrapôs essa teoria, alegando que há diferença entre a capacidade de sofrer e a de não raciocinar, e que, portanto, o uso de animais deveria ser revisto. Essa atitude deu origem a base para os princípios morais e para a legislação atualmente utilizada nas regulamentações éticas dos procedimentos de experimentação animal (Bentham, 1981; Baeder et al., 2012; Miziara et al., 2012; Guimarães; Freire; Menezes, 2016). Charles Darwin publicou em 1859 o livro “A Origem das Espécies”, no qual demonstrou a relação das diferentes espécies animais dentro do processo evolutivo, o que possibilitou a extrapolação dos dados obtidos em

modelos animais para seres humanos (Baeder et al., 2012). Deste modo, no século XIX propagou-se princípios morais e éticos com o crescimento do uso de animais em laboratórios de pesquisa científicas. Com isso, surgiu em 1876, na Inglaterra, a primeira lei com o objetivo de regulamentar o uso de animais em pesquisas e, além disso, também surgiram as primeiras entidades protetoras dos animais em diferentes países (Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004; Guimarães; Freire; Menezes, 2016).

Ainda no século XIX, houve a ascensão da ciência biomédica moderna, o que causou um aumento no número de animais utilizados em experimentos científicos e a opinião sobre o grau de sofrimento experimentado por animais era dividida entre os cientistas e a sociedade. Entretanto, 1922 ocorreu o primeiro importante registro sobre a toxicidade do medicamento Salvarsan[®] (arsfenamina), usado no tratamento da sífilis. Pacientes que fizeram uso desse medicamento desenvolveram icterícia e, a partir desse evento, os cientistas se uniram na crença de que a experimentação em animais era fundamental para a expansão do conhecimento. Dessa forma, o uso de animais para estudar os efeitos adversos de novos medicamentos, aditivos alimentares, praguicidas, entre outras substâncias químicas para os seres humanos foi intensificado (Tagliati et al., 2014).

Em 1927, o farmacologista J.W. Trevan introduziu o teste da DL₅₀ ou dose letal 50% para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos. Esse teste tinha o objetivo de determinar a dose única de uma substância química suficiente para matar metade dos animais expostos a ela (Valadares, 2006; Tagliati et al., 2014; Erhirhie; Ihekwereme; Ildigwe, 2018). Apesar da importância desse teste, a experimentação animal na toxicologia ainda era modesta, o que significa que medicamentos, por exemplo, eram introduzidos na clínica sem que fossem adequadamente avaliados. Nesse cenário, em 1937, ocorreu a tragédia do elixir de sulfanilamida, nos Estados Unidos. A sulfanilamida era um antibiótico muito prescrito e vendido apenas em formulações sólidas até que a S.E. Massengil Company desenvolveu uma formulação líquida com sabor de framboesa utilizando como veículo o dietilenoglicol, um solvente tóxico que causou a morte de mais de 100 pessoas, em sua maioria crianças. Evidentemente, tal fato ocorreu em função de testes de segurança inadequados. Vale ressaltar que, até 1937, a lei norte-americana não proibia a venda de medicamentos não testados, mas esse incidente acelerou a promulgação da Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, em 1938, iniciando um novo período de exigências para a avaliação da toxicidade de produtos farmacêuticos, através de uso animais. Esse estatuto permanece como a base

para a regulamentação da Agência americana de Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*; FDA) para medicamentos (Kawano et al., 2006; Bansal et al., 2015; Tagliati et al., 2014).

Em 1947, foi criado o Código de Nuremberg com dez princípios éticos, sendo que o terceiro princípio determina que “o experimento deve ser baseado em resultados de experimentação em animais e no conhecimento da evolução da doença ou outros problemas em estudo; dessa maneira, os resultados já conhecidos justificam a condição do experimento”. Esse marco foi decisivo para o desenvolvimento de novos medicamentos e intensificou o uso de animais na experimentação científica, sendo que inicialmente, seriam utilizados animais de pequeno porte com similaridades genéticas ao homem. Contudo, embora parecessem adequados para esse fim, os testes em roedores falharam completamente na predição de malformações fetais induzidas pela Talidomida, em milhares de crianças do mundo todo, entre 1956 e 1961 (Tagliati et al., 2014; Ávila; Valadares, 2019).

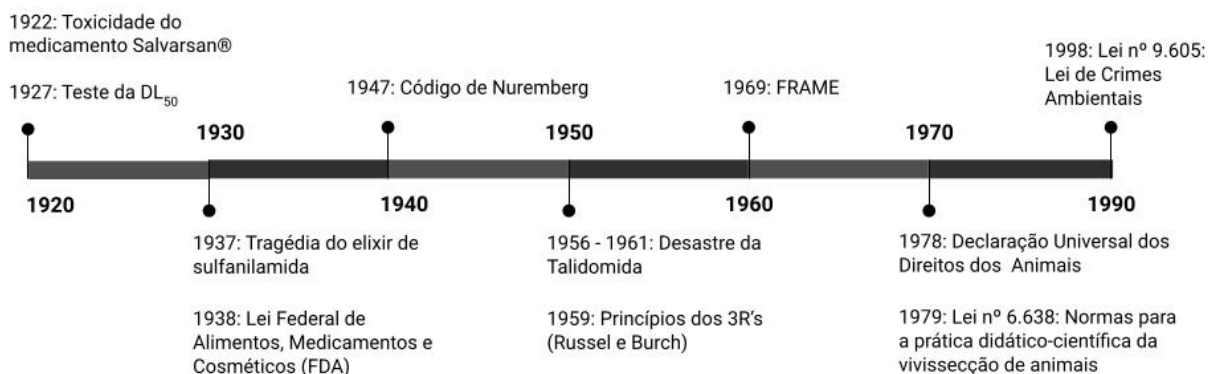
No início do século XX, a Associação Médica Americana fez a primeira publicação acerca de aspectos éticos da experimentação animal (Miziara et al., 2012) e em 1959, na Inglaterra, o zoólogo William Russel e o microbiologista Rex Burch publicaram a obra *The Principles of Humane Experimental Technique*, um marco histórico na experimentação animal e para a avaliação da toxicidade, no qual delinearam princípios ao uso de animais na pesquisa, conhecidos como o princípio dos “3Rs”, da sigla do inglês *Replace*, *Reduction* e *Refinement* (substituição, redução e refinamento). *Replace* (substituição) refere-se à substituição dos ensaios *in vivo* por métodos alternativos como os testes *in vitro* e *in silico*. *Reduction* (redução) indica usar o mínimo de animais em um experimento e *Refinement* (refinamento) significa minimizar o sofrimento, a dor e o desconforto dos animais durante a experimentação, empregando métodos adequados de analgesia, sedação e eutanásia (Russel; Burch, 1959; Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004; Miziara et al., 2012; Baeder et al., 2012; Araújo et al., 2014; Guimarães; Freire; Menezes, 2016; Ávila; Valadares, 2019).

Em 1969, foi realizada a primeira ação em favor dos princípios dos 3R's com a criação do Fundo de Substituição de Animais em Experiências Médicas (do inglês, *Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments*; FRAME), órgão para promover junto à comunidade científica o conceito e desenvolvimento de métodos alternativos (Baeder et al., 2012; Tagliati et al., 2014). Em 1975, Peter Singer publicou o livro *Animal Liberation*, que marcou a década pois ele descreveu as condições as quais os animais

eram submetidos em indústrias de cosméticos e alimentos. A partir de então, os aspectos éticos envolvendo a experimentação animal passou a ser amplamente discutidos no meio acadêmico e científico. Em 1978, a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (Unesco), firmou a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, a qual propôs uma conduta humana com mais dignidade e respeito frente aos animais (Baeder et al., 2012).

No Brasil, a primeira lei específica quanto ao uso de animais na experimentação científica foi a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979, o qual estabeleceu normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (Brasil, 1979; Guimarães, Freire, Menezes, 2016). Anos depois, em 1998, a Lei de Crimes Ambientais, Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, passou a considerar a prática de abuso, maus-tratos, ferimentos ou mutilação de animais domésticos ou de uso para fins didáticos ou científicos, como crime contra o meio ambiente (Brasil, 1998; Ávila, Valadares, 2019). O marco nos aspectos éticos e legais na experimentação animal ocorreu com a publicação da Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), que dispõe sobre os procedimentos para o uso científico de animais e revoga a Lei nº 6.638/1979 (Brasil, 2008). A Figura 1, apresenta um resumo dos acontecimentos significativos durante o século XX.

Figura 1. Cronologia dos acontecimentos significativos quanto ao uso de animais na avaliação da toxicidade durante o século XX.



Fonte: A própria autora.

2.2 Avanços no teste de toxicidade oral aguda *in vivo*

A avaliação da segurança de substâncias químicas para a saúde humana e para o meio ambiente envolvem a identificação e a quantificação dos riscos inerentes a esse agente químico, através de uma análise quantitativa combinada tanto da exposição

quanto do perigo, incluindo a estimativa das incertezas associadas a esses fatores (Lavandeira, 2014; Sturla et al., 2014). Essa avaliação de risco é solicitada pelas agências regulatórias nos processos investigativos desde o desenvolvimento de um produto até o seu registro e a sua comercialização, incluindo seu descarte (Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004).

A avaliação de segurança inicia-se com os ensaios pré-clínicos utilizando metodologias *in vitro* e *in vivo*. Esses ensaios definem indicadores de toxicidade decorrentes da exposição aguda e crônica. A dose letal mediana (DL₅₀) ou a concentração letal mediana (CL₅₀) são frequentemente indicadores de toxicidade aguda. O menor nível de efeito adverso observado (Lowest Observed Adverse Effect Level; LOAEL) e o nível de nenhum efeito adverso observável (No Observed Adverse Effect Level; NOAEL) caracterizam o perfil toxicológico da substância. Esses indicadores e os fatores de incertezas derivados empiricamente, estabelecem diferentes valores de referência de risco, como o nível derivado sem efeito (Derived No-Effect Level; DNEL), que aponta o nível de exposição abaixo dos quais uma substância não prejudica a saúde humana ou ambiental (Lavandeira, 2014; Sturla, et al., 2014).

Os testes toxicológicos pré-clínicos harmonizados e normalmente requeridos para fins regulatórios na avaliação de segurança são os estudos de toxicidade aguda, de toxicidade sub-crônica, de toxicidade crônica, de toxicidade reprodutiva, de toxicidade sobre o desenvolvimento, de genotoxicidade, de carcinogenicidade, de tolerância local e de toxicocinética (Brasil, 2012; Brasil, 2012a; Brasil, 2013; Brasil, 2019). Esses testes geram diversas informações fundamentais para a segurança dos produtos, tais como os indicadores de toxicidade, a relação dose-reposta, o mecanismo de toxicidade nos órgãos alvos, o potencial tóxico em órgãos específico e o potencial de reversibilidade e irreversibilidade de algum efeito nocivo observado (Valadares, 2006; Nugent, Duncan e Colagiovanni, 2017).

A Tabela 1 apresenta os principais testes toxicológicos pré-clínicos harmonizados para avaliação de segurança de substâncias e suas principais características, contudo considerando o objetivo do presente estudo, adiante será abordado mais detalhadamente apenas o teste de toxicidade aguda.

Tabela 1. Teste toxicológicos pré-clínicos harmonizados para avaliação da segurança e suas principais características.

Teste toxicológico	Principais características
Toxicidade aguda	Teste utilizado na avaliação da toxicidade provocada por uma exposição à uma substância-teste por um período curto (não superior a 24 h) a fim de determinar o grau de toxicidade da substância. Esse teste permite determinar a DL ₅₀ e contribui para o planejamento de estudo de toxicidade subcrônica.
Toxicidade sub-crônica	Teste utilizado para determinar o NOAEL e identificar órgãos-alvo de toxicidade e o modo como esses são afetados. Além disso, auxilia no desenho de estudos de toxicidade crônica.
Toxicidade crônica	Teste utilizado para estabelecer o NOAEL e caracterizar a toxicidade de uma substância-teste, após a exposição prolongada (um ano) e repetida.
Toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento	Teste utilizado para identificar algum efeito de uma substância-teste na reprodução de mamíferos. Deve contemplar a fertilidade e o desenvolvimento embrionário inicial, o desenvolvimento pré e pós-natal e o desenvolvimento embrio-fetal. Fornece sobre gametogênese, ciclo estral, comportamento de acasalamento, concepção, manutenção e duração da gestação, parto, tamanho da ninhada, morbidade neonatal, mortalidade, lactação, desmame, desenvolvimento da prole e órgãos-alvo na prole, morte e reabsorção do embrião ou do feto, efeitos teratogênicos (malformações), retardo no crescimento ou atrasos específicos sobre o desenvolvimento e diminuição de capacidades funcionais pós-natal.
Genotoxicidade	Teste utilizado para avaliar o potencial de uma substância-teste causar mutações gênicas e alterações cromossômicas. Fornecem dados que auxiliam na identificação da necessidade de estudos de carcinogenicidade.
Carcinogenicidade	Teste utilizado para avaliar o potencial de uma substância-teste gerar o desenvolvimento de tumores como consequência da exposição, durante um tempo considerável de sua vida, por várias doses da substância-teste e por uma via de administração apropriada.
Tolerância local	Teste utilizado para conhecer se as substâncias testes são toleradas em locais específicos do corpo no qual o produto poderá entrar em contato. Os estudos a serem realizados são os testes de tolerância no local de administração, teste de toxicidade sistêmica, testes de tolerância para vias específicas de administração e potencial de sensibilidade.
Toxicocinética	Teste utilizado para descrever a exposição sistêmica à uma substância teste, obtida em animais, e a sua relação com o nível de dose e o tempo. Além disso, os dados podem contribuir para a segurança clínica, dar suporte à escolha de espécies e regimes de tratamento em estudos de toxicidade não clínica e fornecer informações que em conjunto com achados toxicológicos contribuam para o desenho de estudos não clínicos de toxicidade subsequentes.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013; Brasil, 2019.

Os testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos adversos após a exposição do organismo a uma única ou múltipla dose da substância em 24 h por uma rota conhecida (oral, dérmica ou inalatória) e são utilizados para determinar o potencial de letalidade, estabelecendo o valor da DL₅₀, e o grau de toxicidade das substâncias, principalmente, para atender as agências regulatórias quanto à classificação de risco e rotulagem das

substâncias na indústria química, agroquímica e farmacêutica (Valadares, 2006; Scholz et al., 2014; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018).

Como citado anteriormente, em 1927, foi introduzido o primeiro teste de toxicidade oral aguda, conhecido como teste clássico da DL₅₀, no qual eram usados mais de 100 animais (geralmente ratos e camundongos) para cada substância-teste, divididos em 5 grupos de doses (Valadares, 2006; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018). Esse teste foi amplamente utilizado na década de 70 após as agências regulatórias, como por exemplo, o FDA, exigirem essa avaliação como pré-requisito na aprovação de novos produtos (Valadares, 2006).

A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) inseriu em suas diretrizes, em 1981, o teste da DL₅₀ através da toxicidade oral aguda (OECD TG 401) no qual envolvia o uso de 30 animais divididos em 3 doses, com o objetivo de determinar, através de cálculos estatísticos, a DL₅₀ (Valadares, 2006; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018). Em 1983, o FDA anunciou que não exigiria mais o teste da DL₅₀ para os procedimentos regulatórios, o que ocasionou uma redução significativa no uso de animais. Em 1987, a OECD iniciou alterações no protocolo de toxicidade aguda, reduzindo o número de animais de 30 para 20 (Cazarin, Corrêa, Zambrone, 2004).

A partir de 1992, novos protocolos foram incorporados à OECD para avaliação da toxicidade oral aguda, visando além de determinar o potencial tóxico das substâncias, a redução do número e do sofrimento dos animais, são eles: teste de doses fixas (OECD TG 420), teste de classe tóxica aguda (OECD TG 423) e o teste “*Up and Down*” (OECD TG 425).

O teste de doses fixas (OECD TG 420) tem como objetivo identificar a dose que produz sinais claros de toxicidade, sem causar a morte do animal. A substância avaliada é administrada em um grupo de cinco animais de um único sexo, normalmente fêmeas, para cada dose investigada, em um procedimento gradual usando as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. A seleção da dose é feita através de um estudo de observação da dose que se espera produzir alguns sinais de toxicidade sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade (OECD, 2001; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018).

O teste de classe tóxica aguda (OECD TG 423) consiste em obter informações suficientes sobre a toxicidade aguda da substância em estudo (mortalidade ou sinais de toxicidade) para permitir sua classificação, com a utilização de um número mínimo de

animais por etapa. O procedimento é realizado utilizando três animais de um único sexo, geralmente fêmeas, por meio de um processo sequencial usando as doses de 5, 50, 300 ou 2.000 mg/kg de peso corporal. A ausência ou presença de mortalidade relacionado à substância determinará a próxima etapa do teste, não excedendo seis animais por nível de dose (OECD, 2001a).

O teste “*Up and Down*” (OECD TG 425) tem como objetivo estimar o valor de DL₅₀ de uma substância teste, utilizando animais individualmente, com a dose para cada animal sendo regulada pra cima ou para baixo utilizando um fator de 3,2 com base nos resultados dos testes anteriores. Cada animal deve ser observado por até 48 h antes da tomada de decisão para definir se é necessário dosar no próximo animal e determinar a dose, utilizando um máximo de cinco animais (OECD, 2008; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018).

Em dezembro de 2001, essas três diretrizes foram revisadas e atualizadas e, passaram então, a serem recomendadas e adotadas para avaliação da toxicidade oral aguda. Com isso, a OECD 401 foi oficialmente banida dos procedimentos regulatórios no ano seguinte (Cazarin, Corrêa, Zambrone, 2004; Valadares, 2006; Scholz et al., 2014).

Em 2010, foi publicada a OEDC 129 que estabelece o uso de teste de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para os testes de toxicidade oral aguda. Nesse protocolo, fibroblastos de camundongo BALB/c 3T3 ou queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHK) são avaliados pelo teste de captação de vermelho neutro para determinar o valor de concentração média inibitória (CI₅₀) e estimar o valor de DL₅₀ [$\log DL_{50} \text{ (mg/kg)} = 0,372 \log CI_{50} \text{ (}\mu\text{g/mL)} + 2,024$], o qual será usado para determinar a dose inicial para o teste de doses fixas, teste de classe tóxica aguda ou o teste “*Up and Down*”. A aplicação dos dados de citotoxicidade por meio dessa OECD acarretou a redução de até 40% no uso de animais (Spielmann et al., 1999; Valadares, 2006; OECD, 2010; Scholz et al., 2014).

As diretrizes de avaliação da toxicidade oral aguda *in vivo* apresentam como objetivo a classificação das substâncias avaliadas em categorias de toxicidade sistêmica aguda de acordo com o GHS (OECD, 2001; OECD, 2001a; OECD, 2008). As substâncias podem ser alocadas a uma das cinco categorias de toxicidade, descritas na Tabela 2, com base nos valores estimados de DL₅₀ ou como estimativa de toxicidade aguda (ETA), que pode ser obtida usando a relação DL₅₀/CL₅₀, quando disponível (GHS, 2017).

Tabela 2. Valores da dose média letal (DL₅₀) e os critérios para categorias de toxicidade oral aguda *in vivo*.

Categoria de toxicidade	DL₅₀ (mg/kg peso corporal)	Classificação
Categoria 1	DL ₅₀ ≤ 5	Extremamente tóxico
Categoria 2	5 < DL ₅₀ ≤ 50	Altamente tóxico
Categoria 3	50 < DL ₅₀ ≤ 300	Moderadamente tóxico
Categoria 4	300 < DL ₅₀ ≤ 2.000	Levemente tóxico
Categoria 5	2.000 < DL ₅₀ ≤ 5.000	Praticamente não tóxico
Não Categorizado	DL ₅₀ > 5.000	Relativamente inofensivo

Fonte: GHS, 2017; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018.

A categorização de substâncias químicas de acordo com o GHS visa garantir a segurança dos seres humanos e é baseada em resultados experimentais geralmente obtidos por exposição oral, dérmica ou inalatória de roedores (GHS, 2017). Porém, o uso de animais na experimentação científica apresenta inúmeras desvantagens como o custo elevado, a duração do teste, a baixa capacidade preditiva e a baixa reprodutibilidade (Ball et al., 2014; Ávila; Valadares, 2019).

Dessa forma, há uma forte demanda da sociedade e dos setores industriais pela substituição de experimentos com animais durante a avaliação de segurança. As indústrias farmacêuticas, por exemplo, reduziram os testes de toxicidade oral aguda pois as informações obtidas por esse estudo, durante o processo de desenvolvimento de medicamento, têm pouco valor. (Scholz et al., 2014). Além disso, os órgãos regulatórios de diferentes países, como Estados Unidos, Reino Unido, Alemanha, Brasil entre outros, já aprovaram a utilização de métodos alternativos ao uso de animais no processo de registro de novos produtos químicos (Cazarin, Corrêa, Zambrone, 2004; Brannen et al., 2016).

2.3 Métodos alternativos ao uso de animais na avaliação da toxicidade de novas substâncias

O marco inicial da mudança na experimentação animal foi o princípio dos 3R's, discutidos por Russel e Burch (1959). A partir de então, foram criados diversos centros com a finalidade de desenvolvimento, avaliação e validação de métodos alternativos ao uso de animais, como o Centro Nacional de Documentação e Avaliação de Alternativas

para Métodos de Experimentação Animal (do alemão, *Zentralstelle Erfassung/Bewertung von zur Ersatz und zum Ergänzungsmethoden Tierversuch*; ZEBET) na Alemanha, o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (do inglês, *European Center for the Validation of Alternative Methods*; ECVAM) na União Européia, o Centro de Coordenação Interagências para a Validação de Métodos Alternativos (do inglês, *Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods*; ICCVAM) nos Estados Unidos, o Centro Japonês para Validação de Métodos Alternativos (do inglês, *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) no Japão, e o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (do inglês, *Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods*; BraCVAM) no Brasil (Araújo, et al., 2014; Ávila; Valadares, 2019).

Esses centros são instituições governamentais que dão suporte aos órgãos regulatórios, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e o FDA nos Estados Unidos, com o foco principal da substituição do uso de animais em testes regulatórios para identificar as propriedades tóxicas de substâncias química (Araújo, et al., 2014).

A mudança quanto ao uso de animais na experimentação científica foi acentuado pela toxicologia do século XXI, a qual passou a se dedicar na promoção de testes *in vitro* centrados na biologia humana. Seu marco inicial foi em 2007, após a publicação do relatório do Conselho Nacional de Pesquisa, *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and Strategy* (Ávila; Valadares, 2019).

No Brasil com a publicação da Lei Arouca (Lei nº 11.794/2008) foi estabelecido a criação das comissões de ética no uso de animais (CEUAs), que são responsáveis por fazer a revisão ética de procedimentos de ensino e pesquisa que envolvam a utilização de animais, e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que é o responsável por estabelecer normas para a experimentação animal e estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais para fins científicos e didáticos (Brasil, 2008; Guimarães, Freire, Menezes, 2016; Ávila, Valadares, 2019).

O CONCEA através da Resolução nº 17, de 03 de julho de 2014 reconheceu os métodos alternativos validados (Tabela 3) ao uso de animais em atividade de pesquisa no Brasil e a partir de então a substituição do método original pelo método alternativo passou a ser obrigatório no país (Brasil, 2014; Ávila, Valadares, 2019).

Tabela 3. Métodos alternativos ao uso de animais em atividade de pesquisa no Brasil, reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Avaliação	Guidelines / Testes
Potencial de irritação e corrosão da pele	OECD TG 430 – Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea OECD TG 431 – Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída OECD TG 435 – Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i> OECD TG 439 – Teste de Irritação Cutânea <i>in vitro</i>
Potencial de irritação e corrosão ocular	OECD TG 437 – Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina OECD TG 438 – Teste de Olho Isolado de Galinha OECD TG 460 – Teste de Permeação de Fluoresceína OECD TG 491 – Teste <i>in vitro</i> de Curta Duração para Danos Oculares OECD TG 492 – Epitélio corneal humano reconstituído
Potencial de fototoxicidade	OECD TG 432 – Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
Potencial de sensibilização cutânea	OECD TG 429 – Sensibilização cutânea: Ensaio do Linfonodo Local OECD TG 442A e 442B – Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local OECD TG 442C – Sensibilização Cutânea <i>in chemico</i> OECD TG 442D – Sensibilização Cutânea <i>in vitro</i>
Absorção cutânea	OECD TG 428 – Absorção Cutânea método <i>in vitro</i>
Contaminação pirogênica em produtos injetáveis	Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)
Genotoxicidade	OECD TG 487 – Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>
Toxicidade reprodutiva	OECD TG 421 – Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento OECD TG 422 – Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva
Toxicidade aguda	OECD TG 420 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas OECD TG 423 – Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica OECD TG 425 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento “Up and Down” OECD TG 129 – estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica

Fonte: Resolução Normativa CONCEA nº 18 de 24 de setembro de 2014 e nº 31 de 18 de agosto de 2016

OECD TG: Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, *Organisation for the Economic Co-operation and Development Test Guideline*).

Em 2015, a ANVISA aceitou e regulamentou os métodos alternativos a experimentação animal reconhecidos pelo CONCEA para fins regulatórios mediante a publicação da Resolução do Conselho de Administração Colegiado (RDC) nº 35, de 7 de agosto de 2015 (Brasil, 2015; Ávila, Valadares, 2019).

Nesse contexto, alternativas ao uso de animais vêm ganhando força para a avaliação da toxicidade, como ensaios *in vitro*, com culturas de células e tecidos de mamíferos; testes *in silico*, que usam informações da estrutura molecular das substâncias químicas para a predição da toxicidade; testes *in chemico*, que avaliam a reatividade de uma substância química na ausência do sistema biológico; e ensaios baseados em organismos inteiros, como o uso do estágio embrio-larval de zebrafish (Brannen et al., 2016; Lammer et. al., 2009).

De acordo com um relatório divulgado pela Comissão Europeia no início de 2020 sobre as estatísticas da utilização de animais para fins científicos nos estados membros da União Europeia (UE) no período de 2015 a 2017, o número total de animais usados em pesquisas básicas e aplicadas pelo setor regulatório foi inferior a 10 milhões por ano desse período e, quando comparados com os anos de 2008 e 2011, que tiveram em torno de 11,5 milhões de animais, sugere que o número total de animais usados em pesquisas científicas está diminuindo consideravelmente. Dos 9,39 milhões de animais usados em 2017, 61% eram camundongos, seguidos por peixes (13%) e ratos (12%). Este relatório também apresenta dados sobre a criação e reprodução de animais geneticamente modificados e, em 2017, foram registrados 2,59 milhões de usos de animais geneticamente modificados para fins científicos, sendo o peixe zebrafish e os camundongos as espécies mais utilizadas (EC, 2020; FRAME, 2020).

Considerando os ensaios de segurança que as agências regulatórias exigem para o registro de novas substâncias químicas, os testes de toxicidade pré-clínicos visam prever e prevenir efeitos tóxicos que podem ocorrer na clínica. Assim, os ensaios pré-clínicos são usados na triagem de novas substâncias com objetivo de identificar já nas primeiras fases de estudo os seus prováveis efeitos tóxicos, o que determinará se o desenvolvimento dessa substância poderá prosseguir (Brannen et al., 2016).

Embora os ensaios convencionais com linhagens celulares sejam amplamente utilizados na avaliação pré-clínica da toxicidade, os resultados nem sempre são preditivos de efeitos *in vivo*, pois não permitem a análise da cinética de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de certos compostos. Dessa forma, testes de triagem usando o estágio embrio-larval de zebrafish estão se tornando cada vez mais populares para otimizar o tempo de desenvolvimento de produtos, priorizar candidatos a fármacos para ensaios *in vivo*, projetar estudos mais específicos na avaliação com animais, reduzindo o número de animais na experimentação e, conseqüentemente, os custos desnecessários com esses ensaios (Parrng et. al., 2002; Cassar et al., 2019).

O teste de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish (*D. rerio*) - *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* (OECD TG 236, 2013) já é uma abordagem alternativa reconhecida na avaliação ecotoxicológica, uma vez que os resultados como os estágios embrio-larvais de zebrafish se correlacionam fortemente com os obtidos nos testes de toxicidade aguda com peixes juvenis e adultos (OECD TG 203, 2019). Entretanto, o FET ainda não faz parte das normativas do CONCEA citadas acima, as quais reconhecem o uso de métodos alternativos em atividades de pesquisa validados no país. Portanto, esse modelo pode servir como um passo intermediário entre a avaliação com cultura de células (*in vitro*) e os testes convencionais em animais (*in vivo*) (Parng et. al., 2002; Scholz et al., 2008).

2.3.1 O estágio embrio-larval de zebrafish como modelo preditivo na avaliação da toxicidade

O zebrafish (*D. rerio*), também conhecido como peixe-zebra e, popularmente, como paulistinha (Figura 2), é um peixe teleósteo tropical de água doce, que foi descrito pela primeira vez em 1822 por Francis Hamilton no livro “Um relato dos peixes encontrados no rio Ganges e seus braços”. Ele pertence à família Cyprinidae, subfamília Rasborinae e subgênero *Brachydanio*. É caracterizado pelo pequeno tamanho, já que quando adulto mede em torno de 40 mm de comprimento total, possui corpo fusiforme e comprimido lateralmente, e um padrão de cor distinto baseado em listras horizontais claras e escuras alternadas. Além disso, o zebrafish apresenta nadadeiras dorsais curtas e uma linha lateral incompleta (Spence et al., 2008).

Figura 2. Imagem de posição lateral do zebrafish (*Danio rerio*) evidenciando seu tamanho, coloração e nadadeiras.



Fonte: Adaptado de Dammski et al. (2011).

Seu habitat natural é distribuído por todo o sul e sudeste da Ásia, com a maior diversidade de espécies no nordeste da Índia, Bangladesh, Nepal, Mianmar e Paquistão. O sul da Ásia é caracterizado pelo clima de monções com ampla variação sazonal, marcado por um período do ano de intensas chuvas e outro período de secas rigorosas. Devido ao período de intensas chuvas essas regiões apresentam planícies de inundações, lagos artificiais, lagoas e canais de irrigação, os quais são construídos para o cultivo de peixes e arroz (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008).

O zebrafish tem preferência por águas rasas, sem sombra, com vegetação aquática e seus achados estão, geralmente, associados aos corpos d'água de cultivo de arroz. Nesses corpos d'água são encontrados zooplânctos, principal constituinte da dieta do zebrafish, muito provavelmente relacionados aos fertilizantes utilizados nesse cultivo, os quais promovem o crescimento desses organismos (Spence et al., 2008).

Essa espécie pode ser encontrada em valas de irrigação, tanques de peixes artificiais, cursos superiores de rios e até mesmo riachos de colinas de fluxo rápido. Essa variedade de tipos de habitat em que o zebrafish pode ser encontrado podem variar em suas propriedades físico-químicas, o que qualifica a sua tolerância a alterações ambientais (pH, temperatura e salinidade) em cativeiro. Contudo, essas variações nas condições ambientais podem gerar gastos energéticos, a fim de manter a homeostase, o que pode prejudicar o crescimento, a função imunológica e a reprodução (Lawrence, 2007).

O zebrafish tem sido largamente utilizado em estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e de desenvolvimento de vertebrados, para desvendar as vias de eventos adversos (do inglês, *Adverse Outcome Pathways*; AOP) bem como os mecanismos de ações de diversas doenças humanas e para desenvolver novos agentes terapêuticos. Seu amplo uso é proveniente do trabalho de George Streisinger, que é considerado o introdutor do zebrafish como modelo animal na pesquisa científica e na aplicação de genética de zebrafish para o estudo do desenvolvimento de vertebrados (Spence et al., 2008; Silveira, Schneider, Hammes, 2015). Em 1995, Kimmel e colaboradores também publicaram descrições detalhadas de diferenciação celular do zebrafish e da organização dos seus principais órgãos e seus sistemas de funcionamento (Kimmel et al., 1995; Spence et al., 2008).

Sendo assim, nos últimos anos esse modelo vem atraindo a atenção da comunidade científica. As principais justificativas para isso estão relacionadas as vantagens de utilização desse peixe, como o pequeno porte, facilidade e baixo custo de

manutenção, alta taxa reprodutiva e rápido desenvolvimento (Kimmel et al., 1995; Lawrence, 2007; Scholz et al., 2008; Cassar et al., 2019). Para tanto, é fundamental conhecer algumas características do zebrafish (anatômicas e fisiológicas), assim como os principais parâmetros de qualidade da água, para a adequada criação, manutenção e reprodução desse peixe em biotério (Dammski et al., 2011).

A temperatura é o parâmetro físico que o zebrafish apresenta maior tolerância, podendo variar dentro da faixa de 6,7°C a 41,7°C, sendo a temperatura de manutenção ótima para o zebrafish pode variar de 24°C a 30°C (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008). O pH da água desempenha um papel importante no controle da comunidade microbiana, que é fundamental na metabolização dos resíduos nitrogenados excretados pelos peixes, além de influenciar nos processos biológicos. A faixa de pH ideal para peixes de água doce e para a manutenção da microbiota bacteriana é entre 7 e 8. Já a salinidade da água influenciará no gasto energético para manter o equilíbrio interno de água e sais e, quando se apresenta fora da faixa ideal pode influenciar no crescimento, na sobrevivência e na reprodução, sendo apropriado manter esta estável, em manutenção, dentro da sua faixa de 0,25-0,75 ppt (Lawrence, 2007).

Outros fatores importantes na manutenção e sobrevivência do zebrafish são a dureza da água, o oxigênio dissolvido e a concentração de amônia e nitrito. A dureza da água pode afetar a osmorregulação relacionado à capacidade tampão da água e influenciar a patologia de algumas doenças, sendo o zebrafish uma espécie de “água dura” no qual valores superiores a 100 mg/L CaCO₃ são preferidos. Já o oxigênio dissolvido, a concentração de amônia e de nitrito influenciam diretamente na taxa de mortalidade dos peixes. Os níveis de oxigênio dissolvido ideal é de aproximadamente 8 ppm e sua disponibilidade será determinada pela temperatura, salinidade e qualidade da água. A amônia é tóxica para animais aquáticos assim como o nitrito, um produto intermediário da oxidação da amônia em nitrato, realizada por bactérias nitrificantes, e portanto, precisam ser eliminados em sistemas fechados de recirculação (Lawrence, 2007).

O zebrafish é uma espécie gregária e nadam em pequenos cardumes (5-20 indivíduos). Demonstrem padrões de hierarquia de domínio, a qual não está relacionada ao sexo, podendo ambos os sexos estabelecerem esses padrões, e até que as relações de dominância sejam estabelecidas podem apresentar interações agressivas. O indivíduo dominante pode apresentar cores mais fortes, enquanto os subordinados mais pálidos e,

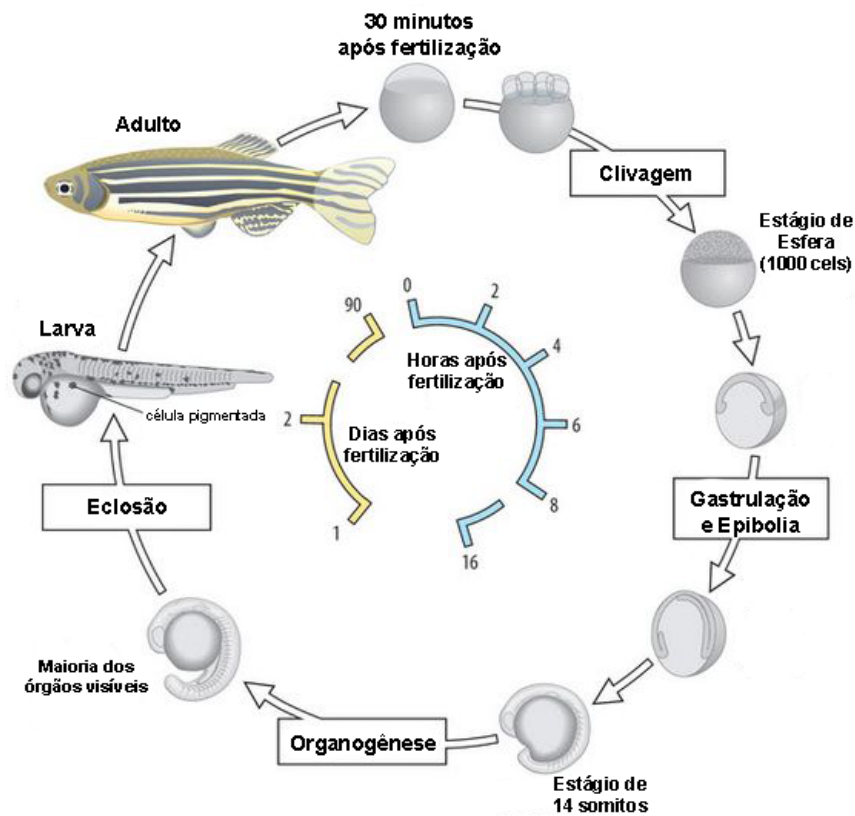
além disso, o dominante ocupa áreas maiores que os subordinados (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008).

Apresenta hábito diurno sincronizado com os ciclos claro/escuro, e por isso a importância do fotoperíodo em biotério, principalmente para a desova, que ocorre tanto naturalmente quanto em peixes em cativeiro, no primeiro pico de atividade, ou seja, no início da iluminação, podendo continuar por cerca de uma hora. O acasalamento do zebrafish inicia com o macho perseguindo a fêmea para conduzi-la ao local de desova, onde ele nadará ao lado da fêmea, estendendo suas nadadeiras dorsais e caudal ao redor dela, alinhando seus poros genitais, o que desencadeia a oviposição e a liberação do esperma simultaneamente. As fêmeas liberam de 5 a 20 ovos por vez e a densidade de peixes pode afetar a desova, caracterizado pela competição entre machos e fêmeas (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008; Lammer, et al. 2009).

Os ovos apresentam 0,7 mm de diâmetro, são não adesivo e demersais e seu desenvolvimento depende da qualidade da água. Os óvulos quando em contato com a água são ativados e mesmo na ausência de espermatozoides podem desenvolver um espaço perivitelínico, mas não conseguem se desenvolver além das primeiras clivagens (Spence et al., 2008). Quando fertilizados se apresentam no estágio de zigoto, por cerca de 40 min após a fertilização, até que ocorra a primeira clivagem, iniciando assim o período de clivagem com as divisões mitóticas no polo animal a cada 15 min. Esse período finaliza cerca de 2 horas pós fertilização (hpf) no estágio de divisão de 64 células (Kimmel et al, 1995).

Em seguida, inicia-se o estágio de blástula que é caracterizado pelo aspecto de esfera e ocorre até pouco mais de 5 hpf, no qual ocorre a formação da blastoderma e as clivagens prosseguem em ciclos prolongados e assíncronos até o início do estágio de epibolia, que só é finalizado no período de gastrulação, evidenciando os movimentos morfogenéticos de involução, convergência e extensão para a origem das camadas germinativas primárias e o eixo embrionário (Kimmel et al, 1995).

Figura 3. Ciclo de vida do zebrafish (*Danio rerio*).



Fonte: Adpatado de D'Costa; Shepherd (2009).

Os embriões apresentam todo o plano corporal já nas primeiras 24 horas pós-fertilização (hpf), são protegidos pelo córion, com poros de 0,5 μm de diâmetro e 2 μm de espaçamento, por até 2 ou 3 dias pós-fertilização (dpf), além disso as células e tecidos precursores do cérebro, olho e coração são facilmente observados nesse período. Os órgãos internos, incluindo intestino, fígado, rim, coração, cérebro e pâncreas são desenvolvidos em 120 hpf e nesse mesmo período a embriogênese já está completa. Os nutrientes são fornecidos pelo saco vitelínico durante os primeiros 7 dpf (Parng et al., 2002; Ali; Mil; Richardson, 2011; Garcia, Noyes, Tanguay, 2016).

As primeiras triagens genéticas no zebrafish forneceram a base para a descoberta de uma série de novos genes e vias fundamentais para o desenvolvimento dos vertebrados e com o sequenciamento completo do genoma do zebrafish foi constatado uma extensa homologia com outras espécies de vertebrados, incluindo humanos (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996; Ali, van Mil, Richardson, 2011; Garcia; Noyes; Tanguay, 2016). Os estágios embrionários apresentam uma similaridade filogenética com os humanos mais ampla que os peixes adultos. Muitos genes padrões são conservados, e

apresentam 86% de ortólogos dos alvos de substâncias e 70% dos genes humanos (Gunnarsson et al., 2008, Howe et al., 2013; Garcia; Noves; Tanguay, 2016).

O rápido desenvolvimento do zebrafish equivale ao período gestacional do desenvolvimento embrionário humano (Tabela 4), e mesmo com a distância evolutiva entre eles, algumas características anatômicas e fisiológicas são funcionalmente conservadas, como o cérebro e os neurotransmissores, a barreira hematoencefálica, o fígado e enzimas metabolizantes como o citocromo P450 e o sistema renal (Parng et al., 2002; Ali; Mil; Richardon, 2011; Garcia, Noyes, Tanguay, 2016).

Tabela 4. Comparação do desenvolvimento nos estágios iniciais da vida do zebrafish, ratos e humanos.

Estágio do desenvolvimento	Zebrafish (horas)	Ratos (dias)	Humanos (dias)
Nidação	NA	6	8–10
Blástula	2–5	3–5	4–6
Formação da pleura neural	10	9,5	17–19
Início da organogênese	10	5	21
Primeiro somito	10–11	9–10	19–21
Formação do tubo neural	18–19	9–12	22–30
Primeiro batimento cardíaco	24	10,2	22
Nascimento/eclosão	48–72	21	253

Fonte: Adaptado de Garcia; Noyes; Tanguay (2016)

Assim, comparado com outros organismos experimentais existe uma forte conservação entre zebrafish e humanos, o que o torna um excelente organismo modelo para avaliar processos biológicos complexos e respostas relevantes sobre o risco de desenvolvimento de mamíferos (Parng et al., 2002; Garcia; Noves; Tanguay, 2016; Cassar et al., 2019). O estágio embrio-larval de zebrafish fornece um sistema multicelular, com a complexidade de um organismo completo, integrando vários tecidos e processos de diferenciação, o que permite desde abordagens mais tradicionais, como mortalidade, até técnicas em níveis moleculares, bioquímicos e comportamentais (Scholz et al., 2014).

Além disso, o zebrafish é considerado um sistema de análise em pequena escala, adequado para experimentos de alta performance e eticamente aceitável em alguns países (Scholz et al., 2008; Strähle et al., 2012; Scholz et al., 2014), já que de acordo com a comissão de regulamentação da União Europeia (Diretriz 2010/63/EU), os ensaios com os estágios embrionários de vertebrados, como o zebrafish, não estão sujeitos às

regulamentações de bem-estar animal, porque os estágios iniciais apresentam menos ou nenhuma dor ou desconforto durante às experimentações e, portanto, são aceitos como alternativa aos experimentos com animais mais complexos (Driessen et al., 2013; Scholz, 2013). Por essas razões, os ensaios com os estágios embrio-larvais de zebrafish foram aceitos pelo FDA para avaliações de toxicidade e segurança de novas substâncias (He et al., 2014; Garcia; Noyes; Tanguay, 2016).

Os modelos clássicos de ensaios pré-clínicos para avaliação da toxicidade oral aguda, utilizando mamíferos, considerados padrão-ouro para avaliação de segurança de novas substâncias, têm sido substituídos na fase de estudo pré-clínica por modelos de manutenção mais fáceis e mais baratos (Garcia, Noyes, Tanguay, 2016). Desse modo, os embriões de zebrafish, os quais inicialmente eram utilizados apenas na avaliação de risco químico em ambientes aquáticos, emergiram nas últimas décadas como modelo de vertebrado na avaliação de toxicidade e segurança de novos compostos e na triagem de candidatos a fármacos, aceitos pela FDA (Parng et al., 2002; Ali; Mil; Richardson, 2011; Scholz et al., 2014; Garcia, Noyes, Tanguay, 2016).

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo pré-clínico, utilizando o estágio embrio-larval de zebrafish para a estimar a toxicidade oral aguda, uma vez que esse modelo experimental pode ser adequado como uma etapa intermediária entre a avaliação *in vitro* e os testes convencionais *in vivo*, por meio das análises da letalidade como também de efeitos subletais (malformações), que poderiam ser associados como um parâmetro complementar para estimar a toxicidade oral aguda *in vivo*.

Os objetivos específicos são:

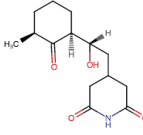


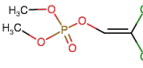
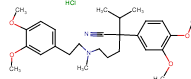

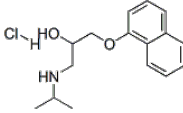
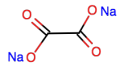
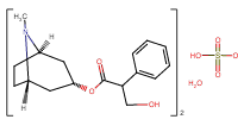
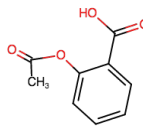
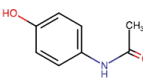
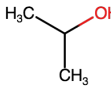
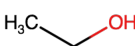
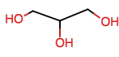
- Avaliar os efeitos tóxicos letais de 15 substâncias com diferente categorização no GHS sobre os embriões e larvas de zebrafish e obter os valores de CL_{50-96h} ;
- Determinar a correlação entre a CL_{50-96h} obtida nos ensaios com os estágios embrio-larvais de zebrafish e a DL_{50} proveniente de dados da literatura referentes à avaliação da toxicidade oral aguda em ratos;
- Avaliar o domínio de aplicação do modelo pré-clínico para estimar a toxicidade oral aguda;
- Avaliar os efeitos subletais de 15 substâncias com diferente categorização no GHS, como um parâmetro complementar para estimar a toxicidade oral aguda *in vivo*;
- Avaliar a aplicabilidade do modelo de correlação utilizando um protótipo a fármaco, o LQFM 021, determinando sua categorização no GHS;
- Determinar a Relação Quantitativa Atividade-Atividade (QAAR) a partir dos dados obtidos de 15 substâncias sobre os embriões e larvas de zebrafish.

4.1. Materiais

4.1.1. Substâncias

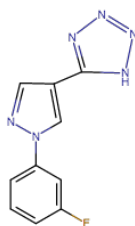
Foram selecionadas 15 substâncias com diferente categorização no GHS, conforme representado na Tabela 5 juntamente com a fórmula estrutural. As substâncias utilizadas para o modelo pré-clínico utilizando embriões e larvas de zebrafish para estimar a toxicidade oral aguda foram selecionadas a partir da lista de substâncias utilizadas no estudo de validação do método de citotoxicidade basal *in vitro* (OECD TG 129), considerando a categorização dessas para a toxicidade oral aguda de acordo com o GHS. As substâncias foram doadas pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *in vitro* (ToxIn), da Faculdade de Farmácia (FF) e pelo almoxarifado do Instituto de Química (IQ), ambos da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Tabela 5 – Substâncias selecionadas para a avaliação da toxicidade aguda utilizando embriões e larvas de zebrafish, as fórmulas estruturais, as categorias de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS) e a faixa de concentração utilizada para avaliação da substância utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish.

Substância	nº CAS	Fórmula estrutural	Categoria (GHS)	Faixa de concentração (mg/L)
Cicloheximida	66-81-9		Categoria 1	0,625 – 10
Sulfato de Tálcio I	7446-18-6	Tl^{+} 	Categoria 2	62,5 – 1000
Cloreto de Mercúrio II	7487-94-7		Categoria 2	0,0625 – 1
Diclorvos	62-73-7		Categoria 3	6,25 – 100
Verapamil HCl	152-11-4		Categoria 3	6,25 – 100
Cloreto de Cádmiio II	10108-64-2		Categoria 3	6,25 – 100
Propranolol	3506-09-0		Categoria 4	6,25 – 100
Oxalato de Sódio	62-76-0		Categoria 4	62,5 – 1000
Sulfato de Atropina	5908-99-6		Categoria 4	62,5 – 1000
Ácido Acetilsalicílico	50-78-2		Categoria 4	62,5 – 1000
Acetaminofeno	103-90-2		Categoria 5	62,5 – 1000
Cloreto de Sódio	7647-14-5	$Na-Cl$	Categoria 5	62,5 – 1000
Álcool Isopropílico	67-63-0		Não Categorizado	62,5 – 1000
Etanol	64-17-5		Não Categorizado	62,5 – 1000
Glicerol	56-81-5		Não Categorizado	62,5 – 1000

O protótipo a fármaco, LQFM 021 [5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-2H-tetrazol] (Figura 4), foi utilizado na aplicação do modelo pré-clínico utilizando embriões e larvas de zebrafish para estimar a toxicidade oral aguda. O composto foi sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da FF da UFG, sob supervisão do Prof^o. Dr. Ricardo Menegatti, obtido através da hibridização molecular da milrinona e cilostazol, inibidores da fosfodiesterase 3 (PDE-3) (Martins et al., 2013).

Figura 4. Estrutura química do protótipo a fármaco, LQFM021.



Fonte: Adaptado de Moura et al. (2017)

4.1.2. Preparo das soluções

As soluções-estoques das 15 substância foram preparadas no momento do uso, utilizando água deionizada para dissolução. As substâncias que não obtiveram completa dissolução com água deionizada, como a cicloheximida e o ácido acetilsalicílico, foram solubilizadas em 1% v/v de etanol (CAS: 64-17-5) ou de dimetilsulfóxido (DMSO; CAS: 67-68-5), respectivamente, não extrapolando 0,5% v/v na maior concentração avaliada. Em seguida, realizaram-se as diluições das concentrações testadas (fator: 2), as quais foram definidas a partir de ensaio preliminar (0,1; 1; 10; 100 e 1000 mg/L; Apêndice A), em água de manutenção (descrita no subtópico 4.3.1.1). A faixa de concentração utilizada para cada substância avaliada está apresentado na Tabela 5.

A solução estoque do protótipo a fármaco LQFM 021 também foi preparada antes do uso, em água de manutenção e foi avaliada nas concentrações de 1; 2,5; 6,3; 15,8; 39,8 e 100 mg/L.

4.2 Coleta dos dados da dose média letal (DL₅₀) em roedores

Os valores estimados de DL₅₀ das substâncias avaliadas foram obtidos do estudo de validação da citotoxicidade basal *in vitro* realizado pela Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos juntamente com o Centro Europeu para Validação de Métodos

Alternativos (NICEATM-ECVAM). Esses valores foram baseados na média geométrica dos valores aceitáveis de DL₅₀ em ratos adultos, apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores estimados da dose média letal (DL₅₀) em roedores.

Substância-teste	DL₅₀ (mg/kg)
Cicloheximida	2
Sulfato de tálio I	25
Cloreto de Mercúrio II	40
Diclorvos	59
Verapamil HCl	111
Cloreto de Cádmio II	135
Propranolol	466
Oxalato de Sódio	633
Sulfato de Atropina	819
Ácido Acetilsalicílico	1.506
Acetaminofeno	2.163
Cloreto de Sódio	4.046
Álcool Isopropílico	5.105
Etanol	11.324
Glicerol	19.770

Fonte: Adaptado de OECD TG 129 (2010)

4.3. Métodos

4.3.1. Teste de toxicidade aguda com embrião de peixe (FET) utilizando zebrafish (*D. rerio*)

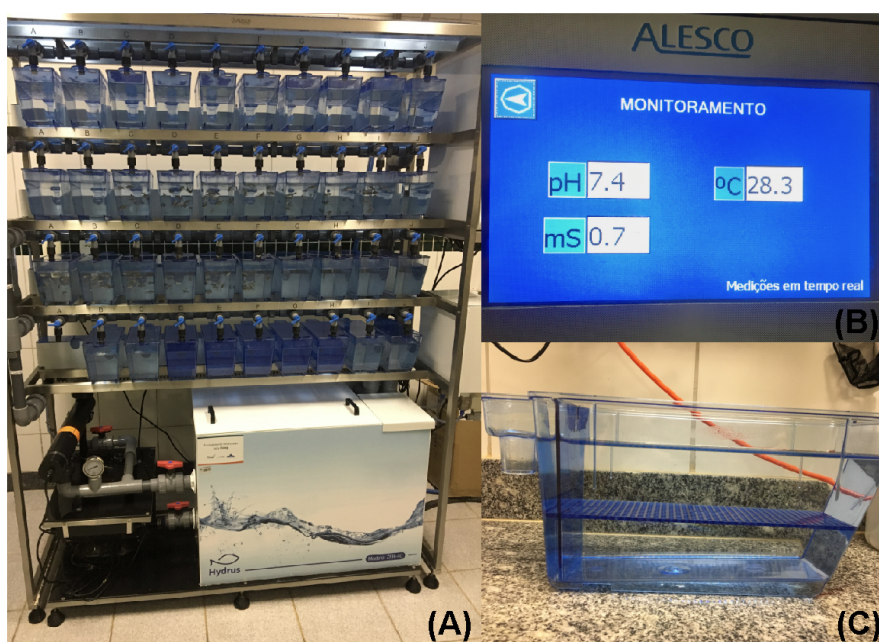
4.3.1.1. Manutenção dos peixes adultos

Os peixes adultos machos e fêmeas de zebrafish foram adquiridos em pet shop local e mantidos em quarentena dentro de aquário de vidro considerando 1 peixe para cada 1 L do volume do aquário, respeitando todos os parâmetros de manutenção, descritos abaixo. Após esse período foram transferidos e mantidos em sistema de recirculação Hack Hydrus (Alesco®, São Paulo, Brasil; Fig. 5A) usando água de osmose reversa (comitê de ética aprovado – PROTOCOLO No. 072/2020; Anexo A). A água passa por diferentes níveis de filtragem (filtro mecânico, químico e biológico) a fim de reter partículas grandes (excretas e excesso de ração) e partículas pequenas (odores e metais

pesados) e eliminar a presença de compostos nitrogenados provenientes da decomposição de matéria orgânica. Além disso, a água é desinfetada por luz UV em ciclos de 12 h e os parâmetros de temperatura, pH e condutividade são regulados automaticamente (Fig. 5B). Essa água é denominada de água de manutenção e ela foi utilizada no preparo das diluições das substâncias avaliadas para a exposição dos embriões de zebrafish.

A temperatura foi monitorada diariamente e mantida a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, pH a $7,5 \pm 0,5$, condutividade a $0,70 \pm 0,1$ mS/cm e oxigênio dissolvido a 8 ppm, com ciclo claro:escuro de 12:12h, mantido por temporizador. Os peixes adultos foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (TetraColor®) e três vezes ao dia com organismo vivo (*Artemia salina*). O excesso de alimentação foi rigorosamente evitado e o restante dos alimentos e fezes foi removido diariamente para assegurar a qualidade ideal da água.

Figura 5. (A) Hack de recirculação utilizada para manutenção dos peixes adultos de zebrafish e obtenção dos embriões. (B) Painel de monitoramento da hack para controle dos parâmetros pH, temperatura e condutividade. (C) Criadeiras utilizadas para obtenção dos ovos de zebrafish.



Fonte: A própria autora

4.3.1.2. Obtenção dos ovos

Machos e fêmeas de zebrafish podem ser distinguidos, para obtenção dos ovos, principalmente pela tonalidade e forma do corpo. Os machos apresentam uma tonalidade

laranja-avermelhada enquanto as fêmeas se apresentam mais acizentada. Quanto à forma do corpo os machos são mais esguios quando comparados às fêmeas, as quais, devido ao grande número de ovos produzidos se apresentam com abdômen mais distendido.

Considerando essas diferenças, no dia anterior ao teste, machos e fêmeas em proporção de 2:1, foram colocados, imediatamente antes do início da escuridão artificial, em criadeiras nos aquários ZebClean na Hack Hydrus (Fig. 5C), as quais possuem suporte para proteger os ovos dos peixes adultos. O acasalamento, a desova e a fertilização ocorrem dentro de 30 minutos após o início da luz artificial. Cerca de 30 minutos após a desova, os ovos foram coletados, lavados com água de manutenção e então transferidos para uma placa de Petri. Todos os ovos foram analisados em estereomicroscópio (Leica S9i, Heerbrugg, Suíça) e os não fertilizados foram descartados. Para os experimentos, foram selecionados ovos que alcançaram o estágio de blástula.

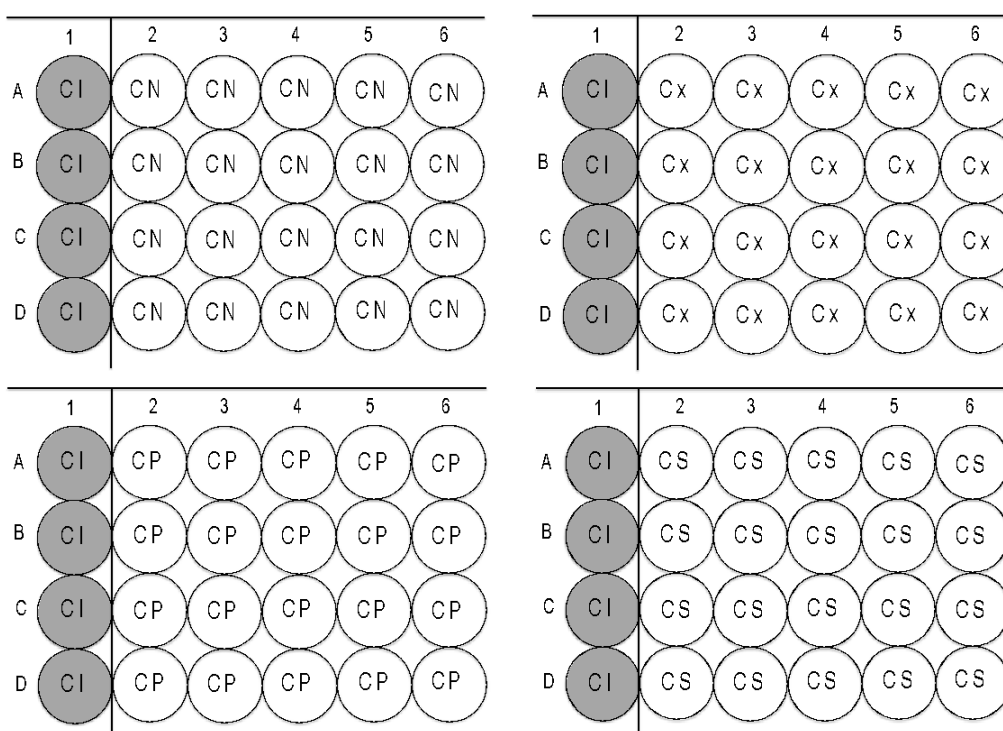
4.3.1.3. *Teste de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish (D. rerio)*

O teste de toxicidade aguda com embriões de zebrafish foi realizado de acordo com o *guideline* OECD 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (2013). Inicialmente, realizou-se um ensaio preliminar para cada substância avaliada utilizando 5 concentrações (0,1; 1; 10; 100 e 1000 mg/L), a fim de definir as concentrações para os ensaios definitivos, considerando a toxicidade individual delas. As concentrações foram definidas a partir da menor concentração que apresentou > 90% de letalidade. As substâncias que não apresentaram essa letalidade nas 5 concentrações testadas após 96 h de exposição, considerou-se a maior concentração (1000 mg/L) utilizada no ensaio preliminar como concentração máxima para o ensaio definitivo.

Os ensaios preliminares foram realizados em placas com 96 poços, nos quais os ovos fertilizados, selecionados previamente, foram dispostos individualmente em poços com 200 µL de cada concentração das substâncias avaliadas assim como para o controle negativo (CN: água de manutenção). Já os ensaios definitivos foram realizados em placas com 24 poços dispondo os ovos fertilizados em 2,0 mL por poço das diferentes concentrações de cada substância ou do controle negativo ou do controle positivo (CP: 4 mg/L de 3,4 dicloroanilina; CAS: 95-76-1) ou do controle de solvente, quando necessário. O experimento preliminar foi realizado em uma única réplica enquanto os experimentos definitivos foram realizados em triplicata. Cada réplica foi constituída por 24 embriões

para o controle negativo (CN), 20 embriões para cada concentração testada de cada substância (Cx), 20 embriões para o controle de solvente (se necessário; CS) e 20 embriões para o controle positivo (CP), com seu respectivo controle interno da placa (CI), apresentado na Figura 6.

Figura 6. Modelo do delineamento experimental para os ensaios definitivos do teste de toxicidade aguda com embrião de peixe (FET) utilizando zebrafish (*D. rerio*), em placas de 24 poços. CN: Controle negativo; Cx: Concentrações das substâncias; CS: Controle de solvente; CP: Controle positivo; CI: Controle interno.



Fonte: A própria autora

Após a exposição dos embriões de zebrafish às substâncias avaliadas, as placas foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e em ciclo claro:escuro de 12:12h. A exposição foi realizada de forma estática, ou seja, durante todo o teste não houve troca de solução. Foram considerados os poços individuais para avaliação do desenvolvimento embrio-larval durante 96 h de exposição.

A cada 24 h foram avaliados os parâmetros letais e subletais dos embriões de zebrafish, utilizando estereomicroscópio (Leica S9i, Heerbrugg, Suíça). Foram considerados como parâmetros letais a coagulação do ovo, a ausência da formação dos somitos, o não descolamento da cauda a partir do saco vitelínico e a ausência de batimento cardíaco. Os parâmetros subletais foram avaliados considerando a distinção

entre o desenvolvimento normal e anormal dos embriões e larvas descrito por Kimmel et al (1995), como por exemplo a taxa de eclosão, a formação dos olhos, a pigmentação corporal e dos olhos, a absorção do saco vitelino, as deformidades da coluna vertebral, a presença de edemas, entre outros.

4.3.1.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® (versão 7.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As comparações entre os diferentes grupos de exposição (por experimento) foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett, o qual foi comparado ao seu controle negativo correspondente. Os valores estimados de CL₅₀ e CE₅₀ foram obtidos da análise de regressão não linear (curva sigmoidal dose-resposta) com intervalo de confiança de 95%. A significância estatística foi aceita quando os resultados apresentaram uma probabilidade sob a hipótese nula (p) inferior a 0,05.

O modelo de regressão linear para avaliar a correlação entre os valores de CL₅₀, obtidos após 96 h de exposição de embriões e larvas de zebrafish e os valores de DL₅₀ obtidos através de estudos de toxicidade oral aguda em ratos (dados da literatura) foi obtido utilizando o software GraphPad Prism® utilizando a correlação pelo coeficiente de correlação não paramétrica de Spearman e de Pearson.

4.3.2. Relação Quantitativa Atividade-Atividade

4.3.2.1. Curadoria dos dados

Os modelos de Relação Quantitativa Atividade-Atividade (do inglês, *Quantitative Activity-Activity Relationship*; QAAR) foram desenvolvidos para prever a toxicidade aguda em ratos (DL₅₀ mg/Kg) e a categorização de acordo com o GHS de novos produtos químicos a partir de descritores toxicológicos (efeitos letais e subletais) experimentais obtidos dos ensaios utilizando os estágios embrio-lavais de zebrafish. Inicialmente, os dados obtidos na avaliação das 15 substâncias utilizando os embriões e larvas de zebrafish, foram importados para o espaço de trabalho no programa *KoNstanz Information MinEr* (KNIME) v.4.1.1 (Aguiar-Pulido et al., 2013; Berthold et al., 2009). Posteriormente, os valores de DL₅₀ (ratos) e CL_{50-96h} (estágio embrio-larval de zebrafish) foram convertidos

em unidades logarítmicas negativas ($-\log$), pDL_{50} e pCL_{50} , respectivamente. Em paralelo, os descritores toxicológicos experimentais (malformações) com valores de CE_{50} determinador, foram binarizados (1 = presente; 0 = ausente).

4.3.2.2. Seleção do descritor

A seleção de descritores é uma abordagem proeminente em estudos QAAR para escolher o número mínimo de descritores com alta capacidade de predição para o modelo. Portanto, os descritores foram selecionados por meio de algoritmo (GA), uma abordagem de otimização estocástica que baseia sua otimização na mecânica da evolução biológica e genética. Semelhante à seleção natural, diferentes soluções (combinações de descritores) são transportadas e transformadas de geração em geração com base em seu desempenho (aptidão) (Sukumar; Prabhu; Saha, 2014). Os descritores selecionados pelo GA foram pCL_{50-96h} , atraso na eclosão, edema de pericárdico, edema de saco vitelino, ausência de equilíbrio, má absorção do saco vitelino, deformidade de cauda, pigmentação corporal e categoria GHS predita com zebrafish. Esse conjunto de descritores foram usados como entrada para a construção do modelo. O valor do coeficiente de correlação R_{ext}^2 (R_{ext}^2) foi usado como função de aptidão do GA.

4.3.2.3. Modelagem QAAR

Inicialmente, o conjunto de dados completo foi dividido em subconjuntos de treinamento (50% das substâncias) e de teste (50% das substâncias) usando a abordagem de distribuição aleatória. Os dados de treinamento foram usados para gerar modelos QAAR, através da técnica de validação cruzada com particionamento dos dados por *leave-one-out*, enquanto os subconjuntos externos (dados de validação ou de teste) foram usados para avaliar o poder preditivo dos modelos.

Em seguida, modelos QAAR contínuos foram desenvolvidos usando combinações pareadas de descritores e os seguintes métodos estatísticos: Regressão Linear Simples, Regressão Linear Múltipla, Regressão Polinomial, Regressão Isotônica (Best; Chakravarti, 1990), Árvores de Decisão Aumentada (*Gradient Boosted Trees*) (Friedman, 2001) e Métodos *Random Forest* (Breinman, 2001).

4.3.2.4. Validação Estatística

O desempenho preditivo dos modelos QAAR foi avaliado usando o coeficiente de correlação (R_{ext}^2), erro absoluto médio (do inglês, *mean square error*; MAE), erro quadrático médio (do inglês, *root mean square error*; RMSE) e coeficiente de correlação quadrático preditivo para o conjunto de teste (Q_{ext}^2) (Consonni; Ballabio; Todeschini, 2009) as métricas foram calculadas da seguinte forma:

$$R_{ext}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{test}} (Y_{obs} - Y_{pred})^2}{\sum_{i=1}^{n_{test}} (Y_{obs} - \underline{Y}_{obs})^2} \quad (1)$$

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^{n_{test}} |Y_{obs} - Y_{pred}|}{n_{test}} \quad (2)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{test}} (Y_{obs} - Y_{pred})^2}{n_{test}}} \quad (3)$$

$$Q_{ext}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{test}} (Y_{obs} - Y_{pred})^2}{\sum_{i=1}^{n_{test}} (Y_{obs} - \underline{Y}_{train})^2} \quad (4)$$

Nas equações acima, Y_{obs} representa pDL₅₀ experimental, Y_{pred} indica o valor predito de pDL₅₀, n_{train} e n_{test} se referem ao número de substâncias do subconjunto de treinamento e de teste, respectivamente. O \underline{Y}_{obs} e \underline{Y}_{train} é a média dos valores experimentais do subconjunto de todos os dados e o de treinamento, respectivamente.

4.3.2.5. Implementação do modelo

Foi desenvolvido um fluxo de trabalho (*workflow*) semiautomático usando o espaço de trabalho KNIME (Aguiar-Pulido et al., 2013; Berthold et al., 2009) para prever pDL₅₀, DL₅₀ e a categoria de acordo com o GHS de novas substâncias com base nos descritores toxicológicos de zebrafish. O fluxo de trabalho desenvolvido foi subdividido em três etapas: (i) inserção manual dos descritores toxicológicos e curadoria automatizada dos dados; (ii) previsão do modelo QAAR; e (iii) visualização e análise dos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Correlação dos efeitos letais para o estágio embrio-larval de zebrafish (CL₅₀) e os dados em roedores (DL₅₀) para estimar a toxicidade oral aguda *in vivo*

Inicialmente, o presente estudo avaliou os efeitos letais (mortalidade) induzidos pelas substâncias testadas sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish após 96 horas de exposição. A Tabela 7 apresenta os valores de CL_{50-96h} das 15 substâncias investigadas.

Tabela 7. Valores de concentração média letal (CL₅₀) das substâncias após 96 h de exposição ao estágio embrio-larval de zebrafish e seu intervalo de confiança (IC).

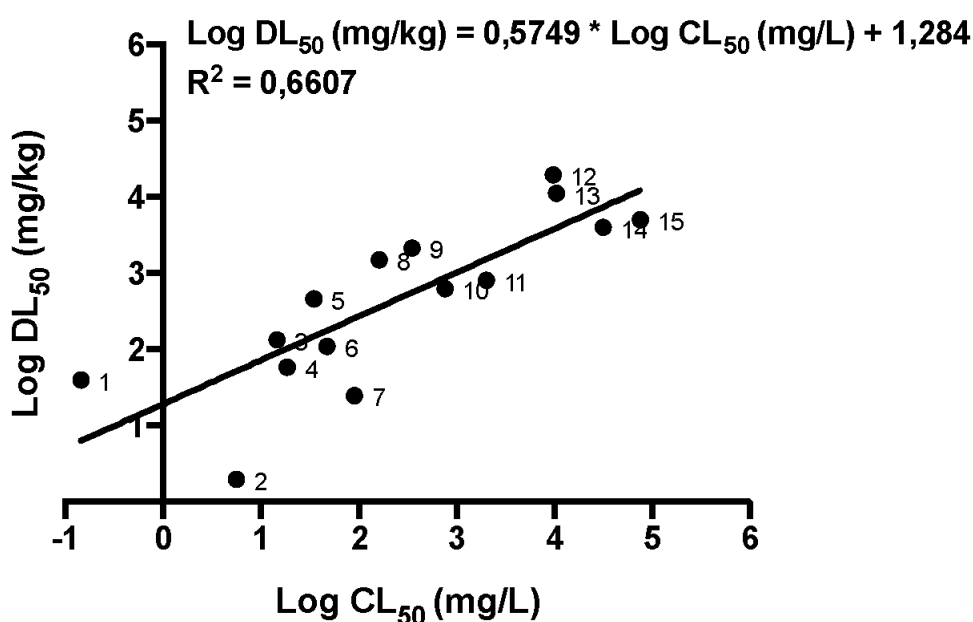
Substância	CL _{50-96 h} (mg/L)	IC 95% (mg/L)
Cicloheximida	5,56	3,19 – 10,05
Sulfato de Tálcio I	88,98	46,51 – 158,60
Cloreto de Mercúrio II	0,14	0,06 – 0,27
Diclorvos	18,34	11,10 – 29,85
Verapamil HCl	46,67	27,65 – 81,01
Cloreto de Cádmiio II	14,35	12,44 – 16,45
Propranolol	34,23	17,21 – 69,65
Oxalato de Sódio	755,80	697,80 – 829,80
Sulfato de Atropina	1.983,00	1.384 – 3.064
Ácido Acetilsalicílico	159,70	74,88 – 326,60
Acetaminofeno	343,80	?? – 389,70
Cloreto de Sódio	31.065,00	15.397 – 895.385
Álcool Isopropílico	74.539,00	30.362 – ??
Etanol	10.298,00	6.059 – 28.087
Glicerol	9.556,00	3.914 – ??

Como pode ser observado, a substância com maior toxicidade aguda para o estágio embrio-larval de zebrafish foi o cloreto de mercúrio II e a menos tóxica foi o álcool isopropílico. Como base na categorização do GHS para toxicidade aguda *in vivo*, essas substâncias são classificadas como categoria 2 (altamente tóxico) e não categorizado (relativamente inofensivo), respectivamente (Tabela 3; GHS, 2017; Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018), ou seja, houve uma similaridade de resposta entre zebrafish e roedores.

Em seguida, os valores de CL_{50-96h} de zebrafish também foram comparados com os valores de DL₅₀ de ratos, obtidos do NICEATM-ECVAM (Tabela 6). A correlação foi obtida utilizando a escala logarítmica desses valores, a partir do modelo de regressão linear, apresentado na Figura 7, o qual resultou na equação (5).

$$\text{Log } DL_{50} \left(\frac{mg}{kg} \right) = 0,5749 * \text{Log } CL_{50} \left(\frac{mg}{L} \right) + 1,284 \quad (5)$$

Figura 7. Correlação entre os valores na escala logarítmica da concentração média letal (CL_{50}) obtidos a partir do ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish e os valores na escala logarítmica da dose média letal (DL_{50}) provenientes da literatura obtidos da toxicidade oral aguda em ratos. Foram avaliadas 15 substâncias: (1) Cloreto de Mercúrio II, (2) Cicloheximida, (3) Cloreto de Cádmio II, (4) Diclorvos, (5) Propranolol, (6) Verapamil, (7) Sulfato de Tálcio I, (8) Ácido Acetilsalicílico, (9) Acetaminofeno, (10) Oxalato de Sódio, (11) Sulfato de Atropina, (12) Glicerol, (13) Etanol, (14) Cloreto de Sódio e (15) Álcool Isopropílico.



O modelo de regressão linear apresentou um coeficiente angular de 0,5749 e linear de 1,284. Além disso, gerou a correlação de Spearman de 0,8607 ($p < 0,0001$) e uma correlação de Pearson de 0,8129 ($p = 0,0002$) entre os valores de DL_{50} e de CL_{50} , o que indica que esses valores co-variam.

Estudos anteriores também sugeriram os estágios embrio-larvais de zebrafish como modelo de avaliação pré-clínica. Parnig e colaboradores (2002) fizeram a triagem de vários fármacos, utilizando embriões e larvas de zebrafish, como modelo preditivo para testes de toxicidade em mamíferos. Os autores avaliaram 18 substâncias e os valores de CL_{50} obtidos foram comparados com os valores de DL_{50} de mamíferos também provenientes de dados da literatura. Os resultados indicaram que a toxicidade de fármacos em zebrafish foram comparáveis às respostas em mamíferos. Em outro estudo, Ali e colaboradores (2011) analisaram 60 compostos e também correlacionaram os valores de CL_{50} obtidos com os valores de DL_{50} de roedores (ratos e camundongos),

obtidos da literatura e obtiveram uma correlação de Spearman de 0,7688 ($p < 0,0001$) e uma correlação de Pearson de 0,7832 mostrando que as variáveis avaliadas são bem correlacionadas. Entretanto, vale ressaltar que ambos os estudos iniciaram a exposição aos embriões de zebrafish apenas após 24 hpf e avaliaram até 120 hpf em placas de 96 poços, o que pode gerar falhas na investigação, uma vez que a não exposição dos embriões já nas primeiras horas da embriogênese (estágio de blástula), conforme indicado na OECD 236, pode influenciar em resultados não confiáveis em relação ao desenvolvimento embrio-larval.

Scholz e colaboradores (2014) fizeram um levantamento bibliográfico considerando trabalhos publicados com os estágios embrionários de peixes de diferentes espécies (*D. rerio*, *Clarius gariepinus*, *Pimephales pamele*, *Oryzas latipes* e *Psetta máxima*), em diferentes tempos de exposição (48 e 96 hpf), expostos à diferentes substâncias. Considerando os valores de CL_{50} de 326 substâncias e os valores de DL_{50} (também obtidos da literatura) a correlação desses parâmetros foi considerada fraca pelos autores, no qual apresentaram um coeficiente linear de 0,84 e R^2 igual a 0,20. Neste estudo a não padronização da espécie avaliada e do tempo de exposição podem ter influenciado na baixa correlação.

Embora haja uma distância evolutiva entre zebrafish e mamíferos, o sequenciamento genômico desse peixe mostrou uma extensa homologia com outras espécies de vertebrados, incluindo os humanos, conservando também diversas vias celulares e moleculares envolvidas na resposta a exposição química ou ao estresse (Ali, van Mil, Richardson, 2011; Garcia, Noyes, Tanguay, 2016).

Como citado anteriormente, os dados de citotoxicidade (com células 3T3 e NHK) já têm sido aplicados para reduzir o número de animais na avaliação da toxicidade oral aguda *in vivo* (OECD, 2010; Spielmann et al., 1999; Valadares, 2006; Scholz et al., 2014) e o estágio embrio-larval de zebrafish poderia ser proposto como uma etapa intermediária entre os ensaios *in vitro* e os testes convencionais *in vivo*, pois fornecem um sistema de análise em pequena escala, mas com a complexidade de um organismo completo (Ali, van Mil, Richardson, 2011; Scholz et al., 2014).

5.1.1 Avaliação do domínio de aplicação do modelo pré-clínico utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish para estimar a toxicidade oral aguda

A avaliação do domínio de aplicação do modelo pré-clínico para estimar a toxicidade oral aguda foi realizada utilizando os valores de CL_{50-96h} das 15 substâncias apresentados na Tabela 7. Esses valores foram aplicados na equação (5) do modelo de regressão linear obtido (Fig. 7), a fim de se obter os valores estimados da DL_{50} . A partir desses valores estimados da DL_{50} , as substâncias foram classificadas de acordo com o GHS (Tab. 2), conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Valores estimados de dose média letal (DL_{50}) e a categorização das substâncias estimada a partir dos valores de concentração média letal (CL_{50}) obtidos no ensaio de toxicidade aguda com os estágios embrio-larvais de zebrafish, após 96 h de exposição, utilizando o modelo pré-clínico para estimar a toxicidade oral aguda.

Substância	CL_{50-96h} (mg/L)	DL_{50} (mg/kg) estimada	Categoria estimada*
Cloreto de Mercúrio II	0,1422	6,27	Categoria 2 [#]
Cicloheximida	5,562	51,57	Categoria 3
Cloreto de Cádmio II	14,35	88,95	Categoria 3 [#]
Diclorvos	18,34	102,35	Categoria 3 [#]
Propranolol	34,23	146,52	Categoria 3
Verapamil HCl	46,67	175,19	Categoria 3 [#]
Sulfato de Tálcio I	88,98	253,79	Categoria 3
Ácido Acetilsalicílico	159,7	355,23	Categoria 4 [#]
Acetaminofeno	343,8	552,01	Categoria 4
Oxalato de Sódio	755,8	868,08	Categoria 4 [#]
Sulfato de Atropina	1.983	1.511,63	Categoria 4 [#]
Glicerol	9.556	3.733,38	Categoria 5
Etanol	10.298	3.900,08	Categoria 5
Cloreto de Sódio	31.065	7.352,77	Não Categorizado
Álcool Isopropílico	74.539	12.159,42	Não Categorizado [#]

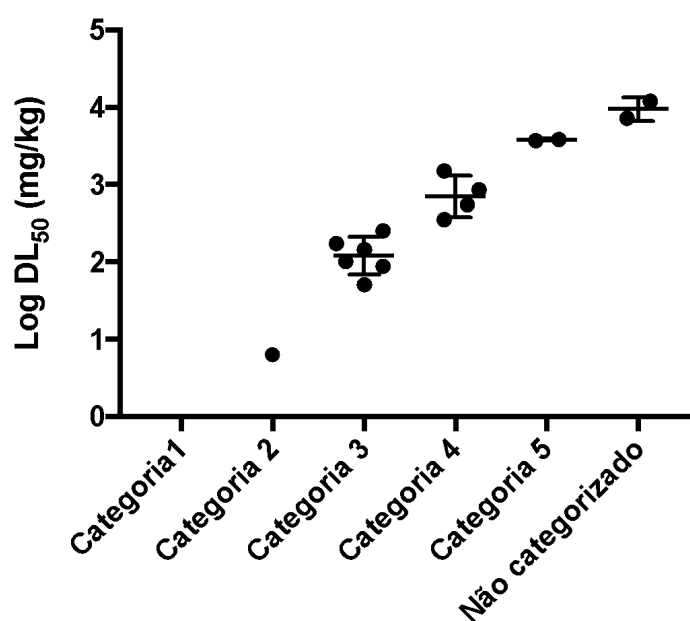
* Categoria de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS).

[#] Capacidade de predição

Desse modo, observa-se que das 15 substâncias aplicadas ao modelo pré-clínico de regressão da toxicidade oral aguda utilizando embriões e larvas de zebrafish, 8 delas (indicadas na Tabela 8) apresentaram categorização semelhante ao preconizado pelos ensaios de toxicidade oral aguda em ratos (Tabela 5). Estes resultados indicam que o ensaio de toxicidade aguda com o estágio embrio-larval de zebrafish foi capaz de prever a toxicidade oral aguda em roedores em 53,33%.

A Figura 8 apresenta a frequência das 15 substâncias nas diferentes categorias de toxicidade oral aguda após a categorização de acordo com a DL₅₀ estimada, utilizando o estágio embrio-larval de zebrafish.

Figura 8. Frequência das diferentes categorias de toxicidade oral aguda, de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS), determinado a partir dos valores estimados na escala logarítmica da dose média letal (DL₅₀) utilizando o modelo pré-clínico utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish para estimar a toxicidade oral aguda. Barras representam média \pm SEM.



Pode-se observar que o modelo pré-clínico proposto apresentou maior tendência de predição nas categorias intermediárias (3 e 4) e de baixa toxicidade do GHS (5 e não categorizado) diferente do que pode ser observado para as categorias de alta toxicidade (1 e 2), no qual apenas 1 substância foi classificada como categoria 2 e nenhuma como categoria 1.

O número de substâncias avaliadas das categorias mais tóxicas (1 e 2) foi baixo, apenas 3 substâncias (cicloheximida, sulfato de tálio I e cloreto de mercúrio II), representando 20% de todas as substâncias, o que pode ter influenciado no deslocamento da categorização para as categorias intermediárias e de baixa toxicidade (3, 4, 5 e não categorizado).

5.2 Análises dos efeitos subletais para o estágio embrio-larval de zebrafish como um parâmetro complementar para prever a toxicidade oral aguda *in vivo*.

Em relação aos efeitos subletais, todas as substâncias induziram anormalidades morfológicas significativas, exceto o ácido acetilsalicílico, cloreto de sódio, álcool isopropílico, etanol e glicerol, como indicadas na Tabela 9.

Tabela 9. Malformações observadas no desenvolvimento embrionário dos estágios iniciais de zebrafish expostos às substâncias após 96 h.

Substância	Deformidade de cauda	Atraso na eclosão	Edema de Pericárdio	Edema de saco vitelínico	Ausência de equilíbrio	Má absorção do saco vitelínico	Pigmentação Corporal
Cicloheximida	X	X	X	X	X	X	*
Sulfato de Tálcio I	X	*	*	*	X	X	*
Cloreto de Mercúrio II	X	*	X	*	X	X	*
Diclorvos	X	X	X	X	X	X	*
Verapamil HCl	X	*	X	*	X	X	*
Cloreto de Cádmio II	*	X	*	*	X	X	*
Propranolol	X	*	*	*	X	X	*
Oxalato de Sódio	*	*	*	*	X	X	*
Sulfato de Atropina	*	*	*	*	X	*	*
Ácido Acetilsalicílico	*	*	*	*	*	*	*
Acetaminofeno	X	*	*	*	X	*	X
Cloreto de Sódio	*	*	*	*	*	*	*
Álcool Isopropílico	*	*	*	*	*	*	*
Etanol	*	*	*	*	*	*	*
Glicerol	*	*	*	*	*	*	*

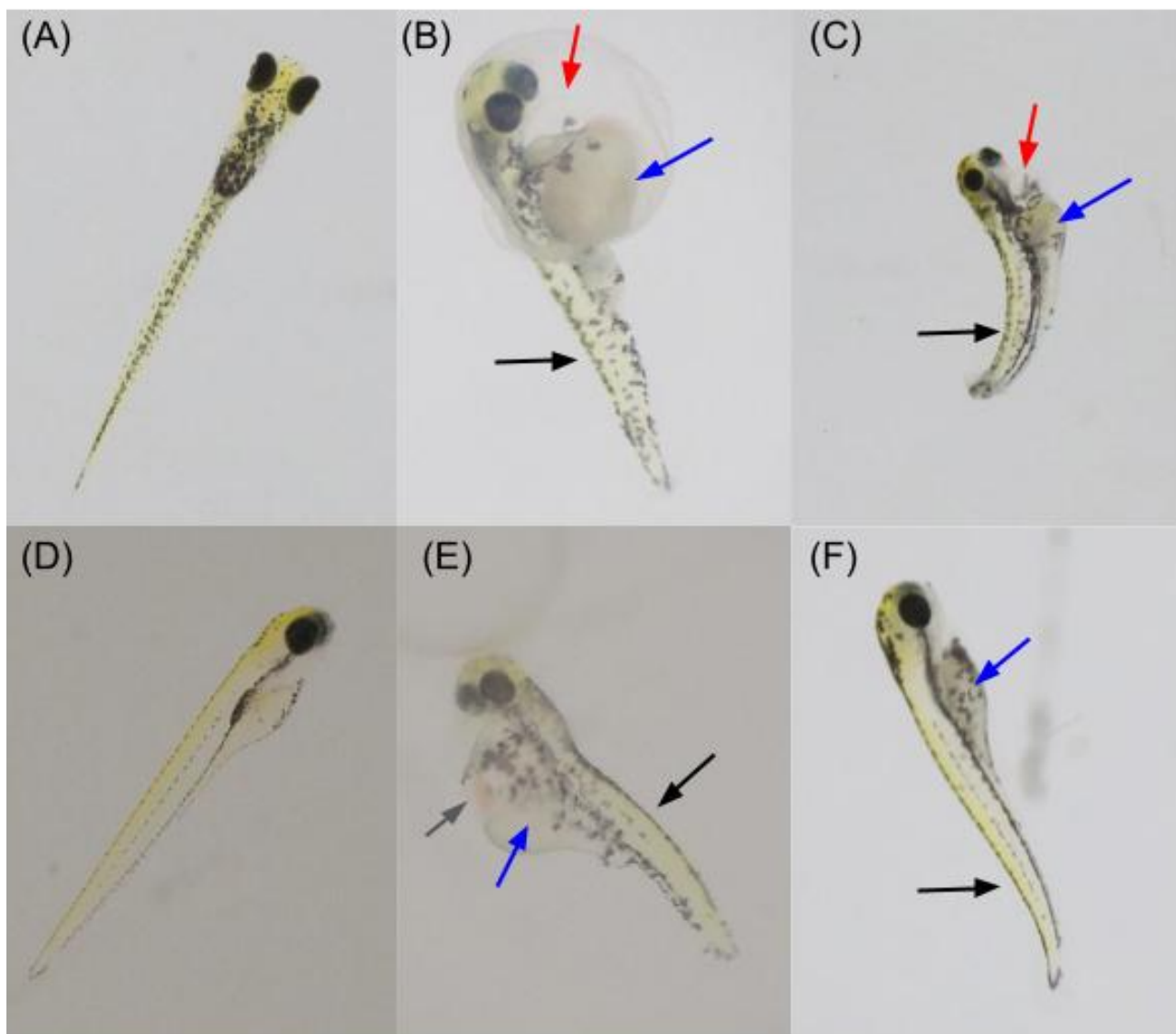
X: Característica morfológica/função afetada

*: Característica morfológica/função não afetada

O desenvolvimento embrionário de zebrafish apresenta uma alta conservação nas interações e respostas biológicas humanas (McGrath; Li, 2008; Garcia, Noyes, Tanguay, 2016; Brannen et al., 2016), por isso a importância desse modelo para avaliação pré-clínica, pois ele permite fazer além da determinação de parâmetros letais, a avaliação de parâmetros subletais, que precedem a letalidade e somados podem evidenciar melhor a toxicidade de compostos (Braunbeck et al. 2015; Hedgpeth et al., 2019).

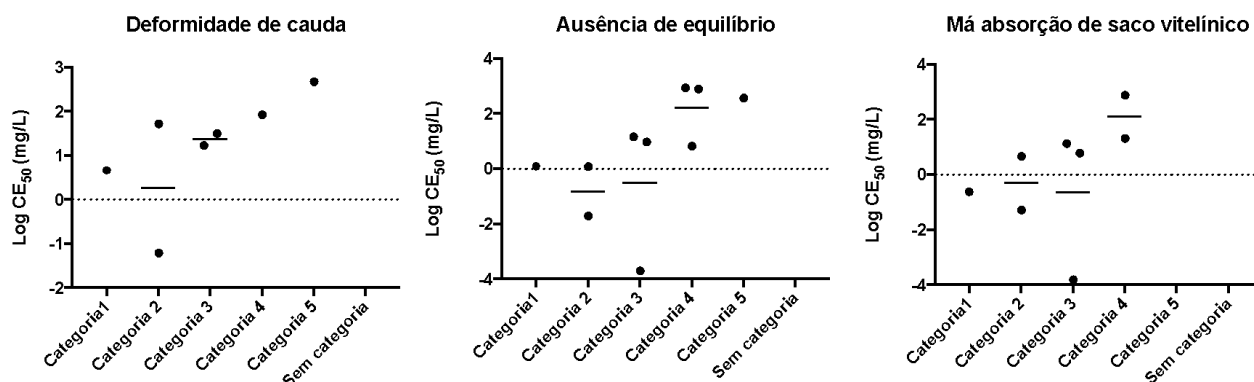
As malformações mais comuns identificadas nos estágios embrio-larvais expostos às 15 substâncias foram: deformidade de cauda, ausência de equilíbrio e má absorção de saco vitelínico, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Fotomicroscopia representativa das principais malformações identificadas nos estágios embrio-larvais de zebrafish após 96 h de exposição à diferente substâncias: (A) Controle Negativo (2x); (B) Diclorvos 25 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta), edema de pericárdio (seta vermelha) e má absorção de saco vitelínico (seta azul); (C) Cloreto de Mercúrio II 0,125 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta), edema de pericárdio (seta vermelha) e má absorção de saco vitelínico (seta azul); (D) Controle Negativo (2x); (E) Cicloheximida 5 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta), edema de saco vitelínico (seta cinza) e má absorção de saco vitelínico (seta azul); (F) Propranolol 25 mg/L (2x) apresentando deformidade de cauda (seta preta) e má absorção de saco vitelínico (seta azul).



A Figura 10 apresenta a frequência de distribuição dessas anormalidades morfológicas mais persistentes, nas diferentes categorias de toxicidade oral aguda, utilizando o estágio embrio-larval de zebrafish.

Figura 10. Frequência de distribuição das malformações mais persistentes nas diferentes categorias de toxicidade oral aguda, de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS), utilizando o estágio embrio-larval de zebrafish.



Portanto, é possível observar que avaliação de parâmetros subletais no FET (OECD 236) agrega valor significativo aos dados de toxicidade aguda com o estágio embrionário de zebrafish em confiabilidade e robustez para um teste já validado e padronizado internacionalmente. O acúmulo de hemácias e a formação de edemas, como os de pericárdio, saco vitelínico e cauda, quando não muito grave, são anormalidades que podem ser reversíveis no desenvolvimento do embrião. Já a deformidade de cauda, malformação de olho e de otólito e malformação craniofacial são anormalidades que raramente se recuperam. Outros efeitos subletais como má absorção ou alterações morfológicas de saco vitelínico e redução na pigmentação corporal ou de órgãos específicos podem ser observados, porém as informações de reversibilidade ainda são limitadas quanto a essas anormalidades. Além desses efeitos, pode-se observar alterações no comportamento como tremor e ausência de equilíbrio, os quais geralmente podem estar relacionados a efeitos neurotóxicos (Hellfeld et al., 2020).

As alterações no comportamento das larvas de zebrafish são mais bem avaliadas com o auxílio de hardware e software específico (Hellfeld et al., 2020). Nesse estudo a avaliação de ausência de equilíbrio foi feita através do estímulo das larvas.

Com base nos valores de CE₅₀ apresentados na Tabela 10, pôde-se observar que a substância de maior toxicidade, em relação à subletalidade, foi o cloreto de mercúrio II e a menos tóxica para esse parâmetro foi o sulfato de atropina. De acordo com o GHS, elas são classificadas como categoria 2 (altamente tóxica) e categoria 4 (levemente tóxica), respectivamente, ou seja, assim como na avaliação dos parâmetros letais, houve uma similaridade de resposta entre zebrafish e roedores.

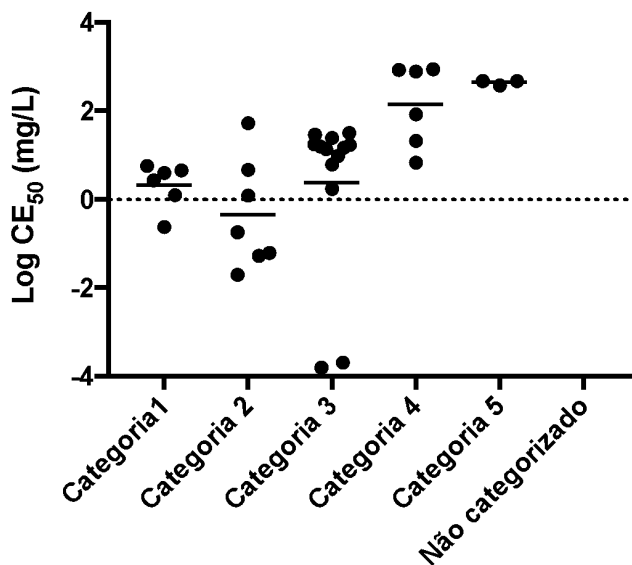
Tabela 10. Valores estimados da concentração média de efeito (CE₅₀) em miligrama por litro (mg/L) dos efeitos subletais nos estágios embrio-larvais de zebrafish após 96 h de exposição às substâncias.

Substância	Deformidade de cauda	Atraso na eclosão	Edema de Pericárdio	Edema de saco vitelínico	Ausência de equilíbrio	Má absorção do saco vitelínico	Pigmentação Corporal
Cicloheximida	4,64	4,02	2,75	5,79	1,27	0,24	*
Sulfato de Tálcio I	53,31	*	*	*	1,25	4,73	*
Cloreto de Mercúrio II	0,06	*	0,18	*	0,02	0,05	*
Diclorvos	32,2	17,78	25,05	29,43	9,76	1,59x10 ⁴	*
Verapamil HCl	17,18	*	15,97	*	14,93	13,81	*
Cloreto de Cádmiu II	*	1,75	*	*	2,08x10 ⁴	6,23	*
Propranolol	85,38	*	*	*	6,91	21,28	*
Oxalato de Sódio	*	*	*	*	885,50	791,30	*
Sulfato de Atropina	*	*	*	*	861,70	*	*
Ácido Acetilsalicílico	*	*	*	*	*	*	*
Acetaminofeno	482,30	*	*	*	384,00	*	480,80
Cloreto de Sódio	*	*	*	*	*	*	*
Álcool Isopropílico	*	*	*	*	*	*	*
Etanol	*	*	*	*	*	*	*
Glicerol	*	*	*	*	*	*	*

* Característica morfológica/função não afetada

A Figura 11 demonstra a frequência dos efeitos subletais, considerando os valores de CE₅₀, por categoria, de acordo com o GHS. A substância de categoria 1 avaliada apresentou 6 efeitos significativos das 7 anormalidades morfológicas. As substâncias de categoria 2 apresentaram em comum as anormalidades de deformidade de cauda, ausência de equilíbrio e má absorção de cauda. As substâncias de categoria 3 desenvolveram em comum a ausência de equilíbrio e a má absorção de saco vitelínico. As de categoria 4 desenvolveram em comum apenas a ausência de equilíbrio. Já na categoria 5 apenas uma substância desenvolveu anormalidades significativas, apresentado deformidade de cauda, ausência de equilíbrio e pigmentação corporal. E por fim as substâncias não categorizadas não apresentaram anormalidade morfológicas significativas.

Figura 11. Frequência de distribuição das malformações nos estágios embrio-larvais de zebrafish, considerando os valores na escala logarítmica da concentração média de efeito (CE₅₀), nas diferentes categorias de toxicidade oral aguda, de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS).



Pode-se observar que as substâncias mais tóxicas classificadas pelo GHS apresentaram maior frequência de efeitos subletais quando comparados às substâncias menos tóxicas e as anormalidades morfológicas mais frequentes se apresentaram em comum em todas as categorias avaliadas. Dessa forma, esses dados confirmam que a associação da análise dos parâmetros subletais na avaliação da toxicidade aguda com o estágio embrio-larval de zebrafish pode fornecer um modelo pré-clínico de avaliação da toxicidade oral aguda *in vivo*, pelo menos como uma etapa intermediária entre os testes *in vitro* e *in vivo*.

5.3 Avaliação da aplicabilidade do modelo de regressão linear, utilizando um protótipo a fármaco, LQFM 021

A avaliação da aplicabilidade do modelo pré-clínico proposto foi realizado a partir do modelo de regressão linear (Fig. 7) utilizando um protótipo a fármaco, denominada LQFM 021, o qual se apresenta como um agente promissor anti-inflamatório, analgésico e antinociceptivo.

Os embriões e larvas de zebrafish foram expostos ao LQFM 021 por 96 h para avaliação de segurança do protótipo a fármaco. Os parâmetros letais e subletais foram avaliados durante todo o período de exposição (dados parcialmente publicados em Moura et al., 2017; Anexo B). Os valores de CL₅₀ de 24 h a 96 h de exposição estão

apresentados na Tabela 11, mas para avaliar a aplicabilidade do modelo foi utilizado apenas o valor de CL_{50-96h} .

Tabela 11. Valores estimados da concentração média letal (CL_{50}) do candidato a fármaco LQFM 021, obtidos após 96 h de exposição aos estágios embrio-larval de zebrafish e seu intervalo de confiança (IC).

LQFM021	CL_{50} (mg/L)	IC 95% (mg/L)
24 h	881,50	497 – 2.751
48 h	767,7	430,2 – 2.378
72 h	767,7	430,2 – 2.378
96 h	203,5	129 – 365,2

O protótipo a fármaco apresentou CL_{50-96h} de 203,5 mg/L e esse valor foi aplicado à equação (5) do modelo de regressão linear a fim de predizer a DL_{50} . A DL_{50} estimada a partir do modelo pré-clínico de predição da toxicidade oral aguda utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish foi de 408,52 mg/kg o que o categoriza, de acordo com o GHS, como uma substância de categoria 4 (DL_{50} entre 300 - 2000 mg/kg), um composto levemente tóxico.

Martins e colaboradores (2013) avaliaram a toxicidade oral aguda do LQFM 021 utilizando o teste de classe tóxica aguda (OECD TG 423), com camundongos fêmeas Swiss. Nesse estudo, o protótipo a fármaco foi categorizado como categoria 4 de acordo com o GHS ($300 < DL_{50} < 2000$ mg/kg) o que corrobora com os resultados obtidos através do modelo pré-clínico de predição da DL_{50} utilizando os estágios embrio-larvais de zebrafish apresentados nesse trabalho.

Além dos efeitos letais do LQFM 021 também foram observados os efeitos subletais durante o período de exposição. Considerando o objetivo desse trabalho, só serão apresentados os efeitos subletais após 96 h de exposição. As larvas após 96 hpf apresentaram ausência de equilíbrio, má absorção do saco vitelínico e edema de pericárdio. Os valores da CE_{50} desses efeitos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores estimados da concentração média de efeito (CE_{50}) dos efeitos subletais em larvas de zebrafish após 96 h de exposição ao LQFM 021 e seu intervalo de confiança (IC)

Efeitos subletais	CE_{50-96h} (mg/L)	IC 95% (mg/L)
Ausência de equilíbrio	77,27	35,38 – 168,80
Má absorção do saco vitelínico	77,68	35,59 – 169,50
Edema de pericárdio	71,28	33,47 – 151,80

As anormalidades observadas nas substâncias de categoria 4 foram deformidade de cauda, ausência de equilíbrio e má absorção de cauda, sendo a segunda a única apresentada em comum para todas as substâncias avaliadas dessa categoria. Dessa forma, as malformações apresentadas pelo LQFM 021 se correlacionam com as avaliadas pelas substâncias de categoria 4. Por fim a avaliação dos parâmetros letais e subletais do LQFM 021 utilizando o estágio embrio-larval de zebrafish apresentaram uma similaridade de resposta entre zebrafish e roedores.

5.4. Modelos de QAAR gerados para prever a toxicidade oral aguda *in vivo*

Antes de desenvolver a modelagem QAAR, uma matriz de correlação de Pearson foi usada como um modelo qualitativo, a fim de identificar descritores altamente correlacionados com o pDL_{50} de ratos e para remover descritores colineares (inter-correlacionados). O uso de variáveis independentes não relacionadas pode melhorar o desempenho preditivo de modelos contínuos, pois apresentam efeitos diferentes sobre a variável dependente.

A Figura 12 apresenta a matriz de correlação entre os descritores toxicológicos e o pDL_{50} de ratos. Não foi observado colinearidade ($R^2 > 0,85$) entre os descritores toxicológicos de zebrafish, porém observou-se que os descritores “ pCL_{50-96h} ” e “má absorção de saco vitelínico” apresentaram considerável correlação ($R^2 = 0,81$) e dependência com a variável dependente, pDL_{50} ($p < 0,001$), o que sugere que ambos os descritores podem ser importantes na predição do pDL_{50} . Por outro lado, alguns descritores apresentaram correlação negativa, como a “categoria GHS predita com zebrafish no modelo de regressão linear” e “ausência de equilíbrio” ($R^2 = -0,82$; $p < 0,001$).

Figura 12. Matriz de correlação entre os descritores toxicológicos (efeitos letais e subletais) e a variável dependente (pDL₅₀). O valor de medida varia de -1 (correlação negativa forte) a 1 (correlação positiva forte). Um valor de 0 representa nenhuma correlação linear. *valor de p < 0,001. A análise estatística foi realizada por meio do teste qui-quadrado de Pearson na matriz do descritor de contingência.

	pDL ₅₀	pCL _{50-96h}	Deformidade de cauda	Atraso na eclosão	Edema de pericárdio	Edema de saco vitelínico	Ausência de equilíbrio	Má absorção de saco vitelínico	Pigmentação corporal	Categoria GHS zebrafish
pDL ₅₀	1,00	0,81*	0,68	0,59	0,69	0,59	0,74	0,81*	-0,17	-0,80
pCL _{50-96h}	0,81*	1,00	0,69	0,44	0,67	0,36	0,72	0,77*	-0,03	-0,96
Deformidade de cauda	0,68	0,69	1,00	0,20	0,64	0,42	0,66	0,61	0,29	-0,71
Atraso na eclosão	0,59	0,44	0,20	1,00	0,45	0,78	0,35	0,47	-0,13	-0,38
Edema de pericárdio	0,69	0,67	0,64	0,45	1,00	0,65	0,43	0,56	-0,16	-0,59
Edema de saco vitelínico	0,59	0,36	0,42	0,78	0,65	1,00	0,28	0,37	-0,10	-0,30
Ausência de equilíbrio	0,74	0,72	0,66	0,35	0,43	0,28	1,00	0,76	0,19	-0,82*
Má absorção de saco vitelínico	0,81*	0,77	0,61	0,47	0,56	0,37	0,76	1,00	-0,29	-0,81
Pigmentação corporal	-0,17	-0,03	0,29	-0,13	-0,16	-0,10	0,19	-0,29	1,00	0,03
Categoria GHS zebrafish	-0,80	-0,96	-0,71	-0,38	-0,59	-0,30	-0,82*	-0,81	0,03	1,00

O uso dos descritores toxicológicos gerou modelos estatisticamente preditivos com valores de R_{ext}^2 variando entre 0,80 e 0,95, Q_{ext}^2 de 0,69 a 0,92, MAE de 0,18 a 0,44 e RMSE de 0,25 a 0,52, apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Desempenho externo dos modelos QAAR desenvolvidos para prever a toxicidade oral em ratos.

Método	Descritores selecionados	R_{ext}^2	MAE	RMSE	Q_{ext}^2
Regressão linear simples	pCL _{50-96h}	0,76	0,66	0,49	0,50
Regressão polinomial	pCL _{50-96h} , atraso na eclosão, má absorção do saco vitelínico e pigmentação corporal	0,86	0,34	0,40	0,82
Regressão linear múltipla	Edema de pericárdio, pigmentação corporal e categoria GHS zebrafish	0,80	0,44	0,52	0,69
Regressão Isotônica	Deformidade de cauda, edema de saco vitelínico, edema de pericárdio, pigmentação corporal e categoria GHS zebrafish	0,90	0,24	0,28	0,90
<i>Gradient Boosted Tress</i>	Deformidade de cauda, categoria GHS zebrafish e pigmentação corporal	0,92	0,25	0,30	0,89
<i>Random Forest*</i>	pCL _{50-96h} , atraso na eclosão, edema de saco vitelínico, ausência de equilíbrio, má absorção de saco vitelínico, pigmentação corporal e categoria GHS zebrafish	0,95	0,18	0,25	0,92

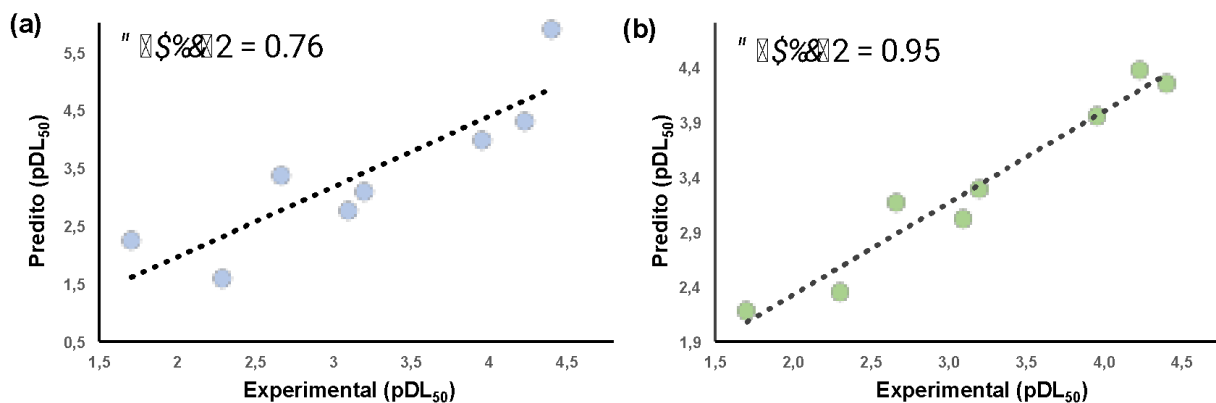
*Melhor modelo QAAR

R_{ext}^2 : coeficiente de correlação do conjunto de teste; MAE: erro absoluto médio (do inglês, *mean square error*); RMSE: erro quadrático médio (do inglês, *root mean square error*); (Q_{ext}^2): coeficiente de correlação quadrático preditivo para o conjunto de teste;

O modelo de regressão linear simples ($pDL_{50} = 0,75 \times pCL_{50-96h} + 0,75$) mostrou desempenho estatístico insatisfatório ($R_{ext}^2 = 0,76$, $Q_{ext}^2 = 0,50$, MAE = 0,66 e RMSE = 0,49), indicando que o pCL_{50-96h} por si só, não é suficiente para prever os valores de pDL₅₀ de novos produtos químicos, diferente do que foi observado no modelo de correlação apresentado anteriormente em que a correlação foi estatisticamente significativa. O gráfico de dispersão dos valores de pDL₅₀ experimental vs. preditos obtidos a partir do modelo de Regressão Linear Simples está apresentado na Figura 13a.

Como a seleção do descritor é um problema proeminente no desempenho de QAAR, foi aplicado um GA para escolher o conjunto ideal de descritores com alta capacidade de predição do pDL₅₀. Como pode ser observado na Tabela 13 e na Figura 13b, o modelo construído usando sete descritores toxicológicos (pCL₅₀, atraso na eclosão, edema de saco vitelino, ausência de equilíbrio, má absorção do saco vitelino, pigmentação corporal e categoria GHS predita com zebrafish) em combinação com o método *Random Forest* demonstrou o melhor desempenho entre todos os outros modelos ($R_{ext}^2 = 0,95$, $Q_{ext}^2 = 0,92$, MAE = 0,18, e RMSE = 0,25).

Figura 13. Gráfico de dispersão dos valores de pDL_{50} observados vs. preditos para as substâncias do conjunto de teste. (a) Modelo de regressão linear simples utilizando a variável independente pCL_{50-96h} e (b) Modelo *Random Forest* utilizando as variáveis independentes pCL_{50-96h} , atraso na eclosão, edema de saco vitelino, ausência de equilíbrio, má absorção de saco vitelino, pigmentação corporal e categoria GHS predita com zebrafish.



De maneira geral, os modelos QAAR gerados neste estudo apresentaram desempenho superior quando comparados aos modelos de regressão publicados por Ali e colaboradores ($R^2 = 0,78$) e Scholz e colaboradores ($R^2 = 0,20$). Conseqüentemente, as malformações observadas nos estágios embrio-larvais de zebrafish podem ser adicionados com sucesso na predição do pDL_{50} de toxicidade oral aguda para novos produtos químicos. Apesar disso, mais dados toxicológicos de zebrafish ainda são necessários para melhorar a relação química-biológico e, assim, aumentar a confiabilidade nas predições.

As representações esquemáticas das árvores (*Trees*) de regressão, obtidas com o método *Random Forest* e que foram usadas para construir o melhor modelo QAAR, estão apresentados no Apêndice B. *Random Forest* é um método de aprendizado de máquina que aprende com os dados do descritor usando um conjunto de árvores de regressão. Cada um dos modelos de árvore de regressão é aprendido em um conjunto diferente de produtos químicos e/ou um conjunto diferente de descritores. O modelo de saída descreve um conjunto de modelos de árvore de regressão e é aplicado no preditor correspondente usando uma média simples das previsões individuais (Breiman, 2001).

Nossos resultados sugerem que os estágios embrio-larvais de zebrafish podem ser utilizados como modelo pré-clínico para estimar/predizer a toxicidade oral aguda, apresentando como um modelo intermediário na avaliação pré-clínica entre os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Portanto podemos concluir que:

- Na avaliação dos efeitos tóxicos letais das 15 substâncias houve similaridade de resposta entre o estágio embrio-larval de zebrafish e roedores;
- A correlação entre a CL_{50-96h} obtida nos ensaios com o estágio embrio-larval de zebrafish e a DL_{50} proveniente de dados da literatura referentes à avaliação da toxicidade oral aguda em roedores foi estatisticamente significativa;
- O modelo pré-clínico para estimar a toxicidade oral aguda apresentou um domínio de aplicação de 53.33%.
- Os efeitos subletais observados nas 15 substância apresentam uma tendência de anormalidades de acordo com a categorização das substâncias, em que as substâncias mais tóxicas classificadas pelo GHS apresentaram maior frequência de efeitos subletais quando comparados às substâncias menos tóxicas e as anormalidades morfológicas mais frequentes se apresentaram em comum em todas as categorias avaliadas;
- O protótipo a fármaco, LQFM 021, foi classificada pelo modelo proposto como categoria 4, de acordo com o GHS, conforme os estudos *in vivo* da literatura;
- O modelo de Relação Quantitativa Atividade-Atividade utilizando sete descritores toxicológicos (pCL_{50} , atraso na eclosão, edema de saco vitelino, ausência de equilíbrio, má absorção do saco vitelino, pigmentação corporal e categoria GHS predito com zebrafish) em combinação com o método *Random Forest* apresentou o melhor desempenho na predição da toxicidade oral aguda *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-PULIDO V, GESTAL M, CRUZ-MONTEAGUDO M, RABUÑAL JR, DORADO J, MUNTEANU CR. Evolutionary computation and QSAR research. **Curr Comput Aided Drug Des.** 2013;9: 206–25.

ALI, Shaukat; VAN MIL, Harald GJ; RICHARDSON, Michael K. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21076, 2011.

ARAÚJO, Gabrielle Luck de et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55-62, 2014.

ÁVILA, Renato Ivan; VALADARES, Marize Campos. Brazil moves toward the replacement of animal experimentation. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 47, n. 2, p. 71-81, 2019.

BAEDER, Fernando Martins et al. Percepção histórica da bioética na pesquisa com animais: possibilidades. **Bioethikos**, v. 6, n. 3, p. 313-20, 2012.

BALL, Jonathan S. et al. Fishing for teratogens: a consortium effort for a harmonized zebrafish developmental toxicology assay. **Toxicological sciences**, v. 139, n. 1, p. 210-219, 2014.

BANSAL, P. et al. Tragedies in clinical trials-a history wrapped up. **Int J Clin Pharmacol Toxicol**, v. 4, n. 3, p. 169-178, 2015.

BENTHAM, Jeremy. An Introduction to the Principles of Morals and Legislation (1789), ed. by J. H Burns and HLA Hart, London, 1970.

BERTHOLD MR, CEBRON N, DILL F, GABRIEL TR, KÖTTER T, MEINL T, et al. KNIME - the Konstanz information miner. **ACM SIGKDD Explor Newsl.** 2009;11: 26–31. doi:10.1145/1656274.1656280

BEST MJ, CHAKRAVARTI N. Active set algorithms for isotonic regression; A unifying framework. **Math Program.** 1990;47: 425–439. doi:10.1007/BF01580873

BRANNEN, Kimberly C. et al. Alternative models of developmental and reproductive toxicity in pharmaceutical risk assessment and the 3Rs. **ILAR journal**, v. 57, n. 2, p. 144-156, 2017.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.** Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências; revogada pela Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008. Disponível em: <http://bit.ly/25utE14>. Acesso em: 20 outubro 2020.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998.** Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 21 outubro 2020.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 21 outubro 2020.

BRASIL. ANVISA. **Guia para avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2ª Edição. Brasília. 2012.

BRASIL. MAPA. **Manual de Procedimentos para Registro de Agrotóxicos**. Brasília. 2012a.

BRASIL. ANVISA. **Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Versão 2. Brasília. 2013.

BRASIL. MCTIC. **Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014**. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. Disponível em: <http://antigo.mctic.gov.br>. Acesso em: 23 outubro 2020.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RDC nº 35, de 7 de agosto de 2015**. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Disponível em: <https://www.in.gov.br/>. Acesso em 23 outubro 2020.

BRASIL. ANVISA. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimento e Ingredientes**. Brasília. 2019.

BRAUNBECK, Thomas et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.

BREIMAN L. Random Forests. **Mach Learn**. 2001;45: 5–32.
doi:10.1023/A:1010933404324

CAPÍTULO: Toxicologia In Vitro – Métodos Alternativos ao Uso de Animais. In: Carlos Alberto Tagliati, José Mauro Granjeiro, Luciene Bottentuit Balottin, Elisa Rosa dos Santos. Livro: Fundamentos de Toxicologia de Seize Oga, Márcia Maria de A. Cmarço e José Antonio de O. Batistuzzo, 4ª edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

CASSAR, Steven et al. A multi-institutional study benchmarking the zebrafish developmental assay for prediction of embryotoxic plasma concentrations from rat embryo–fetal development studies. **Reproductive Toxicology**, v. 86, p. 33-44, 2019.

CAZARIN, Karen Cristine Ceroni; CORRÊA, Cristiana Leslie; ZAMBRONE, Flávio Ailton Duque. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CONSONNI V, BALLABIO D, TODESCHINI R. Comments on the Definition of the Q 2 Parameter for QSAR Validation. **J Chem Inf Model**. 2009;49: 1669–1678.
doi:10.1021/ci900115y

DAMMSKI, Ana Paula et al. Zebrafish-Manual de criação em Biotério. **Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná**, p. 20-1, 2011.

DIRECTIVE, Framework. REPORT FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND TO THE COUNCIL. **2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017**. 2020.

DUCHARME, Nicole A. et al. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: implications for chemical testing. **Reproductive Toxicology**, v. 55, p. 3-10, 2015.

DRIESSEN, Marja et al. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 5, p. 807-823, 2013.

DRIEVER, W. et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. **Development**, v. 123, n. 1, p. 37-46, 1996.

EU, 2020. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. **Off. J. Eur. Union** L276, 34–79.

ERHIRHIE, Earnest Oghenesuvwe; IHEKWEREME, Chibueze Peter; ILODIGWE, Emmanuel Emeka. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. **Interdisciplinary toxicology**, v. 11, n. 1, p. 5-12, 2018.

FRAME. Latest statistics on animal use for scientific purposes in EU. Disponível em: <https://frame.org.uk>. Acesso em: 15 novembro 2020.

FRIEDMAN JH. Greedy Function Approximation: A Gradient Boosting Machine. **Ann Stat.** 2001;29: 1189–1232.

GARCIA, Gloria R.; NOYES, Pamela D.; TANGUAY, Robert L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 161, p. 11-21, 2016.

GUIMARÃES, Mariana Vasconcelos; FREIRE, José Ednésio da Cruz; MENEZES, Lea Maria Bezerra de. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016.

GUNNARSSON, Lina et al. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 15, p. 5807-5813, 2008.

HAFFTER, Pascal et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Development**, v. 123, n. 1, p. 1-36, 1996.

HE, Jian-Hui et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and teratology**, v. 42, p. 35-42, 2014.

HEDGPETH, Bryan M. et al. Analysis of Sublethal Toxicity in Developing Zebrafish Embryos Exposed to a Range of Petroleum Substances. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 38, n. 6, p. 1302-1312, 2019.

HELLFELD, Rebecca et al. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, p. 1-18, 2020.

HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

KAWANO, Daniel Fábio et al. Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los?. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 487-495, 2006.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LAVANDEIRA, Fernanda Márcia Ferreira. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. 2014. Tese de Doutorado. [sn].

LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

Livro GHS, **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) – Purple Book**, 2017

MARTINS, Daniella Ramos et al. Synthesis, Docking Studies, Pharmacological Activity and Toxicity of a Novel Pyrazole Derivative (LQFM 021)—Possible Effects on Phosphodiesterase. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 5, p. 524-531, 2013.

MCGRATH, Patricia; LI, Chun-Qi. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug discovery today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, 2008.

MIZIARA, Ivan Dieb et al. Research ethics in animal models. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 78, n. 2, p. 128-131, 2012.

MOURA, Soraia Santana et al. In vitro genotoxicity and in vivo subchronic evaluation of the anti-inflammatory pyrazole compound LQFM021. **Chemico-Biological Interactions**, v. 277, p. 185-194, 2017.

NUGENT, Paul; DUNCAN, J. Neil; COLAGIOVANNI, Dorothy B. Preparation of a Preclinical Dossier to Support an Investigational New Drug (IND) Application and First-In-Human Clinical Trial. In: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. Academic Press, 2017. p. 189-213.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 401. **Acute Oral Toxicity**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. **Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals , OECD 423. **Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals , OECD 425. **Acute Oral Toxicity - Modified Up and Down Procedure**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals , OECD 129. **Guidance Document On Using Cytotoxicity Tests To Estimate Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Tests**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, **Fish, Acute Toxicity (FET) Test** (Guideline 236), 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, **Fish Embryo Acute Toxicity Testing** (Guideline 203), 2019.

PARNG, Chuenlei et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay and drug development technologies**, v. 1, n. 1, p. 41-48, 2002.

RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard. **The principles of humane experimental technique**. Methuen, 1959.

SCHOLZ, Stefan et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. **Environmental science and pollution research**, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

SCHOLZ, S. Zebrafish embryos as an alternative model for screening of drug-induced organ toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 5, p. 767-769, 2013.

SCHOLZ, Stefan et al. Extensive review of fish embryo acute toxicities for the prediction of GHS acute systemic toxicity categories. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 572-579, 2014.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SPENCE, Rowena et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SPIELMANN, Horst et al. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 27, n. 6, p. 957-966, 1999.

STRÄHLE, Uwe et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 128-132, 2012.

STURLA, Shana J. et al. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. **Chemical research in toxicology**, v. 27, n. 3, p. 314-329, 2014.

SUKUMAR N, PRABHU G, SAHA P. Applications of Genetic Algorithms in QSAR/QSPR Modeling. **Applications of Metaheuristics in Process Engineering**. Cham: Springer International Publishing; 2014. pp. 315–324. doi:10.1007/978-3-319-06508-3_13

VALADARES, Marize Campos. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégia após a "Era do Teste DL50". **Revista Eletrônica de Farmácia**.v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

ANEXOS

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



TERMO DE ATENDIMENTO DE PENDÊNCIAS

USO EXCLUSIVO DA CEUA

PROTOCOLO Nº _____

RECEBIDO EM: ____/____/____

1. TÍTULO:

Os estágios embrio-larvais de zebrafish para prever a toxicidade oral aguda e teratogenicidade em mamíferos

2. RESPOSTA ÀS PENDÊNCIAS

Pendência 1:

No item 12.1. "Tipo e característica do modelo animal", os pesquisadores afirmam que pretendem utilizar 160 peixes adultos com 3 meses de idade (90M/70F). Mas no item 12.5 "Planejamento estatístico" os pesquisadores afirmam que irão utilizar 70M/50F para acasalamento, salientando a proporção 2M/1F. Ainda no item 12.5, os pesquisadores afirmam que será utilizado 3 aquários por substância teste, com 9 peixes em cada um (6M/3F), o que totaliza 27 peixes. Também relatam que serão testadas 25 substâncias. Isso totalizaria 675 peixes (450M/225F – considerando 25 substâncias teste multiplicada por 27 peixes). Isso, sem considerar as 5 doses a serem testadas para cada substância teste. Portanto, essa comissão solicita esclarecimentos do total de animais a serem utilizados como progenitores, sendo discriminada a proporção/sexo (respeitando a relação 2M/1F), ou como será feito o planejamento de acasalamento de 160 animais (90M/70F), os quais não atendem a relação de 2M/1F. Além disso, solicitamos também, descrever como esse planejamento deverá atender a proporção de 9 peixes (6M/3F) por substância teste, com capacidade de produção de 60 ovos/ciclo reprodutivo, para a produção de 500 ovos/tratamento, respeitando a semana de descanso no acasalamento, como relatado no item 12.5

Resposta à pendência 1:

- A informação presente no item 12.1 "Tipo e característica do modelo animal" de 160 peixes é uma estimativa do número total de peixes adultos que serão necessários para obtermos cerca de 500 ovos fertilizados por substância-teste (30 substâncias no total) e para um projeto que deverá ser executado até março de 2022. Essa estimativa do número total de peixes é feita considerando 5 a 6 peixes por substância-química analisada e também pelo tempo de capacidade reprodutiva do peixe, que é cerca de 1 ano. A proporção de machos e fêmeas dos peixes adultos a serem adquirido não precisa ser, necessariamente 2M/1F como utilizamos nos acasalamentos, devido à dificuldade de se obter peixes em idade reprodutiva e o intervalo de descanso que precisa ser dado às fêmeas entre as reproduções. Como relatado na ficha de protocolo, nós compramos os peixes adultos em petshops, e a maioria dos fornecedores não possuem esse tipo de informação/conhecimento. Na maioria das vezes, durante a compra dos peixes adultos, fazemos uma análise visual do tamanho do peixe, de forma a adquirir peixes adultos jovens (em idade reprodutiva), que apresentem 2 a 3 cm de comprimento. No entanto, essa avaliação do tamanho durante a compra dos peixes não é algo fácil de se fazer, devido a intensa e constante movimentação dos peixes na água, o que significa que, juntamente com os peixes adultos jovens (em fase reprodutiva) são adquiridos peixes em fase juvenil, especialmente machos, sem maturidade sexual. Nós também temos dificuldades em obter fêmeas, já que a grande maioria dos peixes adultos que são fornecidos por petshops é macho. Além disso, podemos ter o fracasso na reprodução, por usar peixes adultos (machos e fêmeas) no acasalamento sem maturidade reprodutiva, sendo necessário separá-los para ocorrer o amadurecimento sexual e acompanhar outros fatores que possam estar influenciando no sucesso da obtenção dos ovos fecundados. A redução, especialmente no número de fêmeas, para considerar a proporção 2M e 1F, pode ter impacto negativo no número de reproduções realizadas e, consequentemente, no tempo de execução do projeto.

- Já em relação ao item 12.5 "Planejamento estatístico", há algumas informações incoerentes, como indicado por essa comissão, que provavelmente ocorreram pela construção da ficha protocolo desse projeto ter sido baseada em outro comitê de ética aprovado e, também por ter sido considerado o planejamento para análise de 25 substâncias e não 30, como será definitivamente realizado. Eu peço desculpas pelas falhas em informações de extrema importância para a

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFUG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás,
Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



condução desse projeto e solicito a reconsideração da comissão, com base nas modificações e esclarecimentos em relação a esse item. O planejamento estatístico do número de animais usados nesse projeto é determinado por uma estimativa do número de ovos fertilizados obtidos por ciclo reprodutivo. Os peixes adultos serão usados apenas para o acasalamento, ou seja, para a obtenção dos ovos, não sendo expostos a qualquer substância-teste. Para a avaliação dos efeitos tóxicos (letais, subletais, citotóxicos e bioquímicos) de cada substância-teste (30 substâncias no total) serão necessários, pelo menos 480 ovos fecundados (cada substância-teste será avaliada em 5 concentrações e com 3 controles, ou seja, o controle negativo, positivo e o de solvente, quando necessário, em triplicata, com 20 embriões para cada concentração ou controle por réplica) que serão obtidos durante o acasalamento entre machos e fêmeas. Considerando que cada fêmea desova cerca de 60 ovos por reprodução, precisamos, no mínimo, de 8 fêmeas e 16 machos em fases reprodutivas para obter 480 ovos fertilizados. A distribuição desses 24 peixes por aquário pode variar, mas iremos usar 2 aquários de reprodução de 15 L, com 4 fêmeas e 8 machos cada um. Vale ressaltar que muitas vezes não conseguimos obter essa quantidade necessária para cada substância-teste (480 ovos), fazendo uma única reprodução em 2 aquários. Já tivemos experiências bem negativas durante semanas de ensaios que podem variar desde a obtenção de um número muito baixo de ovos fertilizados, insuficientes para realizar uma réplica do experimento, ou ensaios em que os controles negativos não atingem o critério de validação de 80% de viabilidade até 96 horas de pós-fertilização. Nesses momentos fazemos a rotatividade dos peixes durante os acasalamentos e analisamos minuciosamente cada parâmetro de qualidade da água de manutenção dos peixes adultos, como também o comportamento diário dos peixes frente a alimentação e níveis de atividade ao longo de cada dia. É importante comentar dependendo das resposta de toxicidade aguda, algumas substâncias necessitarão de uma nova exposição em concentrações subletais para a obtenção dos dados de citotoxicidade e parâmetros bioquímicos e, talvez, isso amplie o número de ovos necessários por substância-teste. Então na ficha protocolo foi descrito o uso de cerca de 500 ovos para todas as substâncias-testadas, porque não sabemos qual será a resposta tóxica da grande maioria delas. Além disso, tivemos dificuldades em adquirir as substâncias-químicas mais tóxicas de acordo com o GHS (toxicidade oral aguda para roedores), devido ao alto custo, mas recentemente, conseguimos algumas doações e iremos cumprir o projeto aprovado pelo CNPq, testando 30 substâncias químicas ao invés das 25 substâncias, como foi relatado na ficha protocolo.

- Sobre o esclarecimento do total de animais a serem utilizados como progenitores, gostaria de explicar que não há uma relação direta entre o grupo de 24 peixes adultos (16M e 8F, como esclareci/corrigi acima) por acasalamento e por substância-teste analisada, já que os mesmos peixes adultos poderão ser utilizados para a obtenção de outros ovos a serem expostos as demais substâncias-testes, sempre promovendo, pelo menos, uma semana de intervalo para as fêmeas que já participaram da reprodução. Considerando os 160 peixes, serão quase 7 grupos distintos de 24 peixes (16M e 8F) para fazermos a rotatividade entre os grupos, que pela nossa experiência com outros projetos de pesquisa que executamos desde 2014, será suficiente para realizar as reproduções e obter cerca de 500 ovos por substância-teste. Ainda vale lembrar que, como os peixes adultos serão utilizados, exclusivamente, para a obtenção dos ovos, ou seja, não serão utilizados experimentalmente, após cada reprodução, eles retornarão para os aquários de manutenção e os grupos poderão ser repetidos ou não, sempre respeitando os intervalos das fêmeas.

Pendência 2:

Esclarecer qual será o modelo experimental utilizado, se é o peixe adulto, os ovos, os embriões ou as larvas, com a respectiva discriminação do número de indivíduos para cada tratamento e o número total de cada um (adulto, ovo, embrião ou larva)

Resposta à pendência 2:

Nós avaliaremos apenas a fase embrio-larval de zebrafish, ou seja, inicialmente, os ovos fertilizados, contendo o embrião, serão expostos às substâncias-testes e como a duração do teste será realizado até 168h, isso significa que iremos utilizar como modelo experimental os embriões e larvas de zebrafish, já que de 0 a 48 h de desenvolvimento, o zebrafish estará na fase embrionária e após a eclosão (em até 50h) até 168 h, ele estará na fase larval. Para cada tratamento (cada concentração das substâncias-testes e controles) serão utilizados cerca de 60 ovos (20 ovos por réplica), ou seja, 60 embriões e 60 larvas (caso o desenvolvimento da fase larval ocorra, o que dependerá da toxicidade das substâncias-testes). Esse número poderá ser ampliado a depender da toxicidade das substâncias-testes, ou seja, da necessidade de se realizar o experimento preliminar (para a definição das concentrações definitivas dos testes) ou experimentos com concentrações subletais (para avaliar o efeito citotóxico e/ou parâmetros bioquímicos). Esse fato dependerá da resposta de cada



substância e será avaliado caso a caso essa necessidade de se ampliar o número de embriões e larvas expostos. Não iremos usar os peixes adultos como modelo experimental, já que em momento algum, eles serão expostos às substâncias-testes, apenas serão utilizados no acasalamento para a obtenção dos ovos (embriões e larvas).

Pendência 3:

Essa comissão solicita que seja esclarecido o total de substâncias teste a ser utilizada, pois no item 12.5 da ficha de protocolo os pesquisadores afirmam que serão utilizadas 25 substâncias químicas (substância teste) e em outro parágrafo deste mesmo item e no projeto, afirmam que serão avaliados cerca de 30 compostos teste. Essa comissão entende que a diferença de apenas 5 compostos no teste implicaria em mais 135 peixes e 2500 ovos (500ovos/tratamento), considerando que são 3 aquários/substância teste, 9 peixes/aquário, totalizando 27 peixes/substância teste

Resposta à pendência 3:

Como esclarecido na Pendência 1, inicialmente, nós tivemos dificuldades em obter as substâncias de maior toxicidade, de acordo com o GHS para toxicidade oral aguda em roedores, principalmente devido ao alto custo e pequenas quantidades, mas no mês passado (início de novembro), conseguimos algumas doações e iremos cumprir na íntegra o projeto aprovado pelo CNPq, testando 30 substâncias químicas ao invés das 25 substâncias, como foi relatado na ficha protocolo. Por favor, considere o total de substâncias-teste a ser utilizada como 30. Como citado anteriormente, manutenção de 5 a 6 peixes adultos por substância-teste (total 160 peixes) e a rotatividade dos grupos de peixes na proporção 2M e 1F, durante os acasalamentos, serão suficientes para obter cerca de 500 ovos por substância-química.

Pendência 4:

Na descrição da metodologia no projeto e no item 18 da ficha de protocolo, os pesquisadores relatam várias técnicas em que embriões e larvas serão homogeneizados para as referidas dosagens bioquímicas, ou que serão corados, ou ainda, fixados e emblocados em parafina para análises morfológicas. Não foi encontrado relato do que será feito dos progenitores, uma vez que não serão utilizados experimentalmente, e sim para fornecer ovos/embriões (vide 1º parágrafo do item 12.5). Porém, nos itens 13.1, 17.1 e 17.3 da ficha de protocolo, os pesquisadores afirmam que após overdose de anestesia os embriões e larvas serão descartados em lixo hospitalar para incineração. Portanto, essa comissão solicita esclarecimento do correto destino dos embriões e larvas, e dos animais adultos utilizados como progenitores; e

Resposta à pendência 4:

Os animais adultos utilizados como progenitores serão devolvidos para os aquários de manutenção, após cada acasalamento. Os peixes adultos jovens de zebrafish se reproduzem continuamente durante a maturidade sexual e o tempo de manutenção deles no biotério irá depender dessa capacidade reprodutiva e do estágio de maturidade sexual em que foram obtidos. Nós temos observado que, em média, eles permanecem sexualmente ativos por 1 ano e após esse período eles serão doados aos petshops ou trocados por algum insumo como ração, cerâmica, ou seja, como não são expostos a qualquer substância química, eles não são sacrificados após a inatividade sexual.

Pendência 5:

No item 17.2 da ficha de protocolo "Descrição de método de eutanásia" os pesquisadores afirmam que será realizada a eutanásia por "hipóxia em solução tamponada de sulfonato metano de tricaina (MS222)". Não foi encontrada na bibliografia citada nenhuma recomendação de uso de hipóxia para eutanásia:

1. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - Tabela 1: Agentes e métodos de eutanásia por grupo taxonômico, Classe Osteichthyes;
2. Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais do CRMV - página 38 – Peixes e anfíbios, item c. Imersão;
3. Diretrizes para Uso de Zebrafish do NIH;

Portanto, essa comissão solicita maiores esclarecimentos sobre o uso de hipóxia associada ao anestésico MS222 como método de eutanásia.

Resposta à pendência 5:



A tricaina (MS222) é um dos anestésicos mais utilizados na eutanásia de peixes ósseos, como o zebrafish, por imersão em solução tamponada até o pH 7, devido ao seu caráter ácido. Esse anestésico inibe a propagação de potenciais de ação, bloqueando os canais de sódio, resultando na cessação dos movimentos operculares, que pode ser visualizada no peixe adulto de zebrafish, mas não nas fases embrionárias desse peixe. Para as formas embrio-larvais, a visualização dos batimentos cardíacos pode ser usada como uma forma mais direta de avaliar o potencial anestésico e como um indicador de morte tecidual, devido à falta de oxigênio.

Dessa forma, considerando as dificuldades em avaliar a anestesia nas formas embrionárias de zebrafish, a eutanásia de peixes adultos doentes e embriões/larvas (modelos experimentais) será realizada de acordo com as diretrizes para o uso do zebrafish do NIH (2009), atualizado em 26 de fevereiro de 2020.

- Para peixes adultos de zebrafish doentes (≥ 15 dpf): será realizada a imersão prolongada (por até 30 min) em solução de MS-222 a 200 a 300 mg/L tamponada com bicarbonato de sódio (pH 7,0 – 7,5).

- Para formas embrio-larvais de zebrafish (≤ 7 dpf): será realizada a imersão em hipoclorito de sódio a 6,15% por 5 minutos.

Todas as etapas de eutanásia serão realizadas em tanques isolados, ou seja, fora do sistema de manutenção dos peixes. Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program (2009).

Copie, cole e preencha as tabelas, quantas vezes forem necessárias, até que todos as pendências sejam contempladas.

3. ADEQUAÇÃO DO CRONOGRAMA

O cronograma de atividades desse projeto foi elaborado para o período de 12 meses, com data de encerramento em 03 de março 2022, como demonstrado a seguir (ver tabela):

- (i) Revisar a literatura pertinente ao assunto do projeto de pesquisa.
- (ii) Fazer a manutenção dos peixes adultos de zebrafish no período de quarentena;
- (iii) Realizar a criação e manutenção dos peixes adultos de zebrafish após o período de quarentena;
- (iv) Promover o acasalamento e a colheita dos ovos de zebrafish;
- (v) Avaliar a toxicidade aguda de cerca de 30 substâncias químicas com diferente categorização no GHS (categoria 1 a 5) sobre embriões e larvas de zebrafish, analisando indicadores toxicológicos de letalidade (CL50), subletalidade (CE50) e teratogenicidade (IT50);
- (vi) Implantar e realizar os ensaios de citotoxicidade, marcadores bioquímicos e de outras alterações morfológicas com larvas de zebrafish;
- (vii) Aplicar os modelos classificatórios gerados (toxicidade aguda e teratogenicidade) para uma nova molécula ou princípio ativo (ex. fármaco, repelente, extrato vegetal);
- (viii) Elaborar relatórios e resumos científicos; trabalhos de conclusão de curso, dissertações e teses

TABELA. Distribuição das atividades em 12 meses.



Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2021												
i												
ii												
iii												
iv												
v												
vi												
vii												
viii												
2022												
i												
ii												
iii												
iv												
v												
vi												
vii												
viii												

*Este campo deverá ser preenchido somente quando necessário e independente de constar a solicitação nas pendências. Caso tenha pendência sobre o cronograma, não há necessidade de preenchimento deste campo novamente, basta constar no ITEM 2.
O cronograma de execução deverá ser reprogramado caso o tempo para o atendimento da pendência ultrapasse os 60 dias requeridos pela CEUA no momento da submissão do projeto.*

4. TERMO DE RESPONSABILIDADE (LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)

Eu, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (nome do responsável), certifico que:
a) li o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura do Responsável pela Pesquisa: 

Data: 10 / 12 / 2020



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

In vitro genotoxicity and *in vivo* subchronic evaluation of the anti-inflammatory pyrazole compound LQFM021



Soraia Santana de Moura ^a, Renato Ivan de Ávila ^a, Lara Barroso Brito ^a, Rhaul de Oliveira ^{b,c}, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira ^a, Francine Pazini ^d, Ricardo Menegatti ^d, Aline Carvalho Batista ^e, Cesar Koppe Grisolia ^b, Marize Campos Valadares ^{a,*}

^a Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica (GeTOX), Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

^c Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes (LEAL), Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, São Paulo, Brazil

^d Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^e Departamento de Estomatologia (Patologia Oral), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2017
Received in revised form
22 August 2017
Accepted 5 September 2017
Available online 7 September 2017

Keywords:

Pyrazole
Molecular hybridization
Zebrafish
Subchronic toxicity
Genotoxicity
Anti-inflammatory drugs

ABSTRACT

Scientific evidences have highlighted 5-(1-(3-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2H-tetrazole (LQFM021) as a promising anti-inflammatory, analgesic and antinociceptive agent due to its effects on peripheral opioid receptors associated with activation of the nitric oxide/cGMP/K_{ATP} pathway. Despite these important pharmacological findings, toxicity data of LQFM021 are scarce. Thus, this study investigated the *in vitro* genotoxicity of LQFM021 through cytokinesis-block micronucleus assay (OECD N° 487/2014). Moreover, zebrafish model was used to assess the embryotoxicity potential of LQFM021 using fish embryo toxicity test (OECD N° 236/2013) with extended exposure to evaluate subchronic larval development. *In vivo* subchronic toxicity of LQFM021 in rats (OECD N° 407/2008) was also conducted. This compound at the lower concentrations tested (3.1 and 31 µg/mL) did not promote changes in micronuclei frequency in HepG2 cells. However, in the higher concentrations of LQFM021 (310 and 620 µg/mL) triggered a significant increase of micronucleated HepG2 cells, showing an alert signal of potential genotoxicity. Regarding the oral treatment of rats with LQFM021 (62.5, 125 or 250 mg/kg) for 28 days, the main findings showed that LQFM021 promoted renal and liver changes in a dose-dependent manner, being irreversible damage for kidneys while liver tissue showed a recovery after 14 days post treatment. Regarding embryotoxicity, although the lower concentrations used did not show toxicity, the concentration of LQFM021 (39.8 and 100 mg/L) promoted malformations in zebrafish embryo-larvae stage, in especial cardiac tissue changes. In conclusion, anti-inflammatory compound LQFM021 seems to have some limiting factors as a new therapeutic option to be used orally and in high repeated doses, related to those found in the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrazole derivatives, which containing an aromatic five membered heterocyclic ring with two nitrogen atoms [19], have

gained attention due to their wide applications in several research fields, in especial in drug discovery and development [18].

The broad range of biological activities of pyrazole analogs has allowed the development of several pharmacological agents, including molecules with antibacterial [6], anticancer [21,29], analgesic [1,27], anti-inflammatory [1,6,7] and cardiovascular [10,16] potential. In fact, several anti-inflammatory drugs carrying pyrazole scaffold are already commercially available, such as celecoxib, deracoxib and dipyron [19]. However, some pyrazole derivatives have been withdrawal from clinical practice or used with

* Corresponding author. Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás, Rua 240 esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605.170, Brazil.

E-mail addresses: marizecv@ufg.br, marizeufg@gmail.com (M.C. Valadares).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.09.004>

0009-2797/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

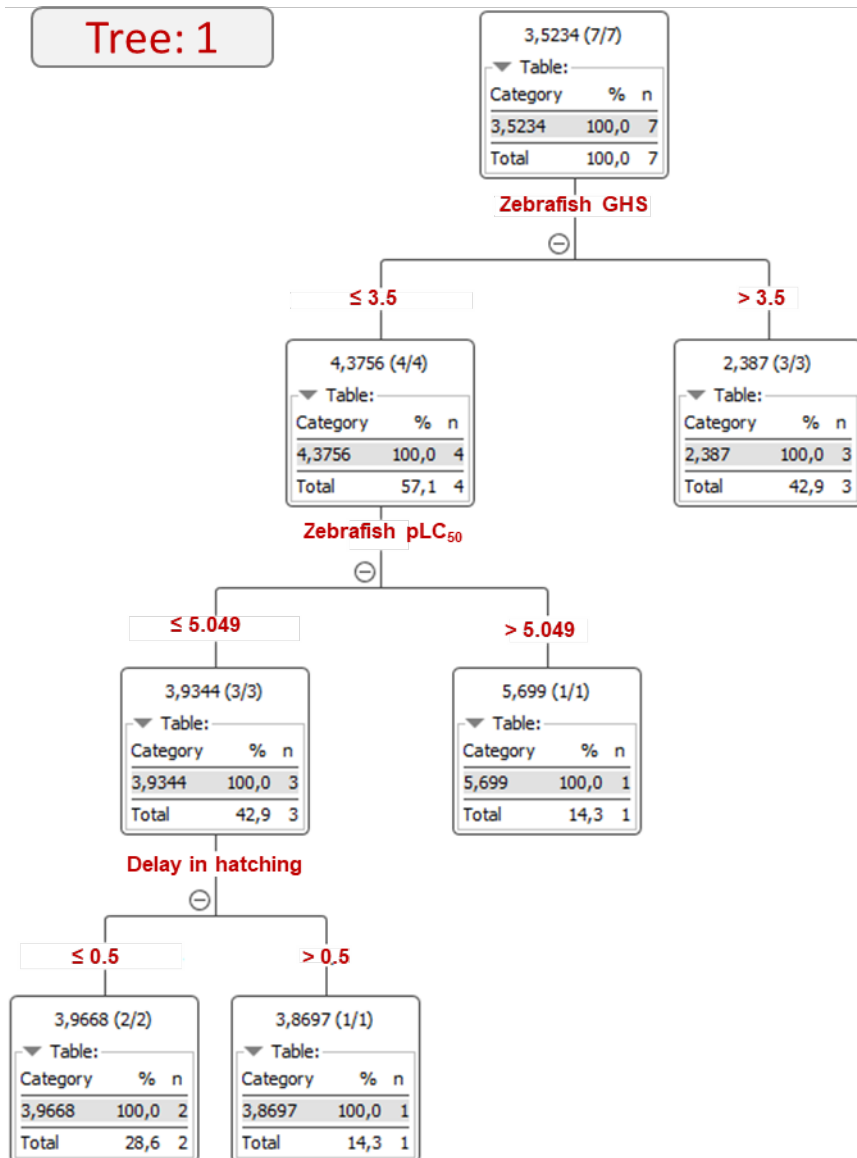
APÊNDICES

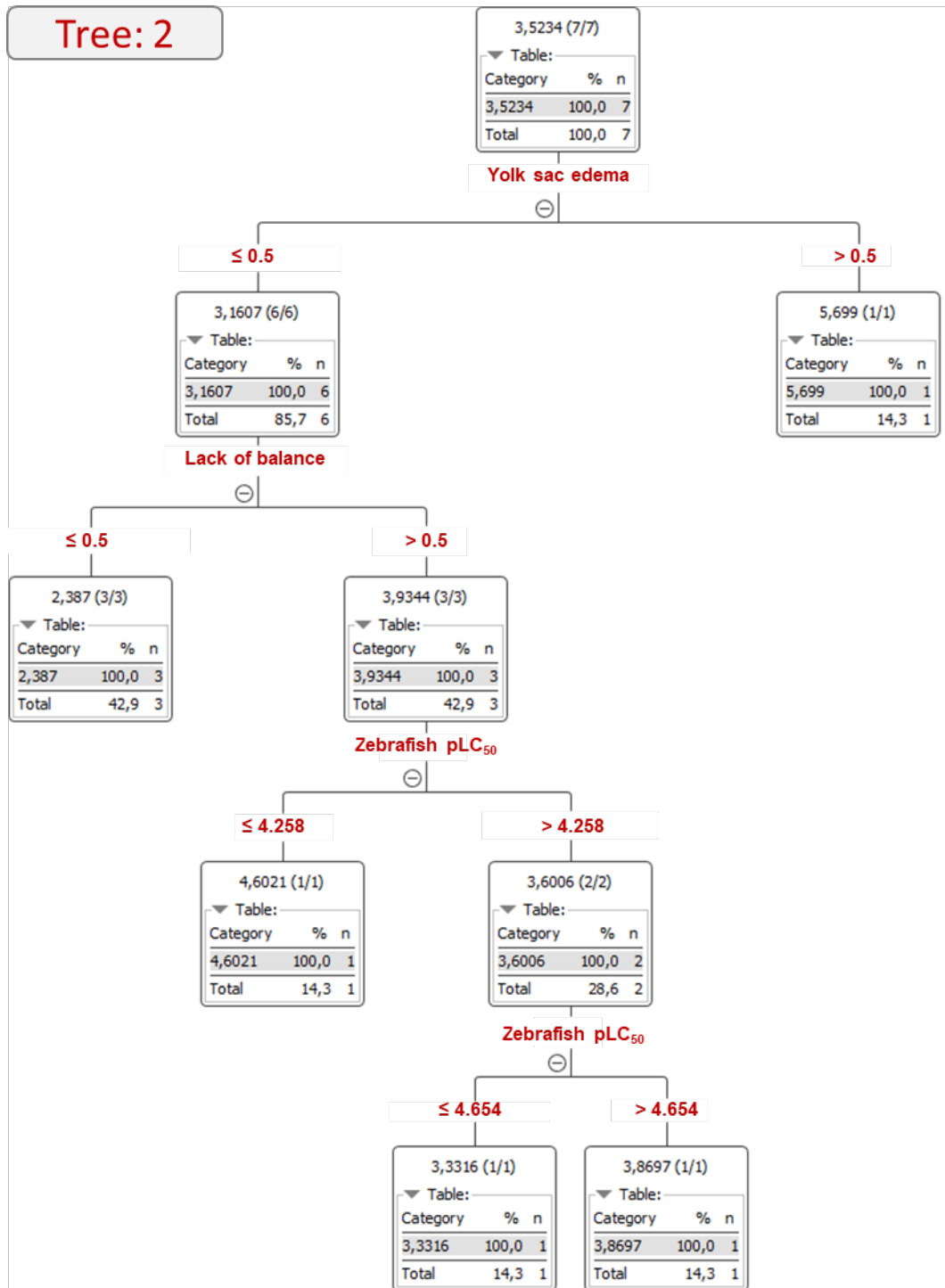
Apêndice A - Taxa de mortalidade induzida pelas diferentes concentrações das substâncias-teste após 96 h de exposição ao estágio embrio-larval de zebrafish.

Concentração (mg/L)	CN	0,1	1	10	100	1000
Cicloheximida	5%	5%	5%	90%*	100%	100%
Sulfato de tálio I	0%	40%	0%	15%	0%	55%*
Cloreto de Mercúrio II	0%	0%	100%	100%	100%	100%
			*			
Diclorvos	5%	20%	5%	10%	100%*	100%
Cloreto de Cádmio II	0%	0%	10%	10%	100%*	100%
Verapamil HCl	5%	5%	0%	20%	100%*	100%
Propranolol	0%	5%	0%	0%	100%*	100%
Oxalato de Sódio	5%	0%	5%	10%	5%	65%*
Sulfato de Atropina	0%	5%	5%	10%	10%	5%*
Ácido Acetilsalicílico	10%	15%	50%	50%	35%	100%*
Acetaminofeno	10%	40%	55%	55%	50%	100%*
Cloreto de Sódio	10%	0%	0%	5%	0%	10%*
Álcool Isopropílico	5%	0%	0%	0%	5%	5%*
Etanol	5%	5%	15%	5%	5%	25%*
Glicerol	5%	10%	15%	10%	20%	5%*

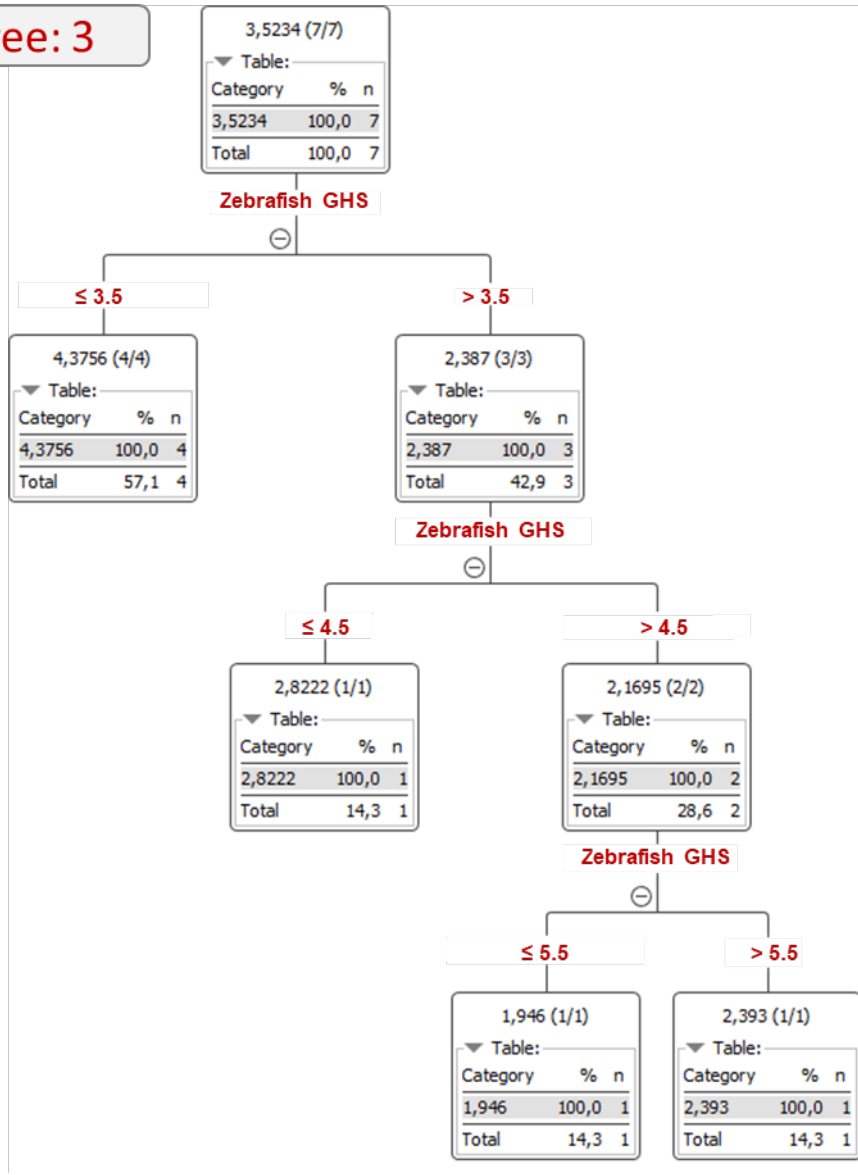
*Maior concentração utilizada no ensaio definitivo.

Apêndice B – Informações de suporte

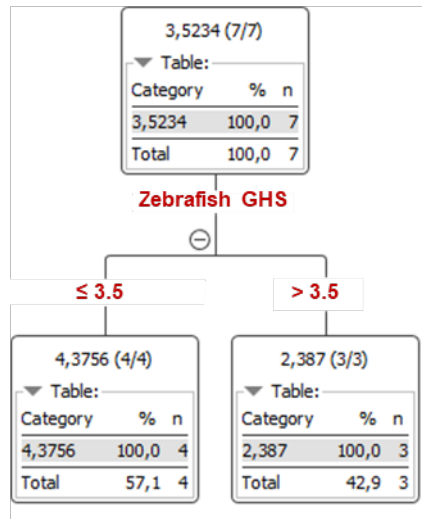




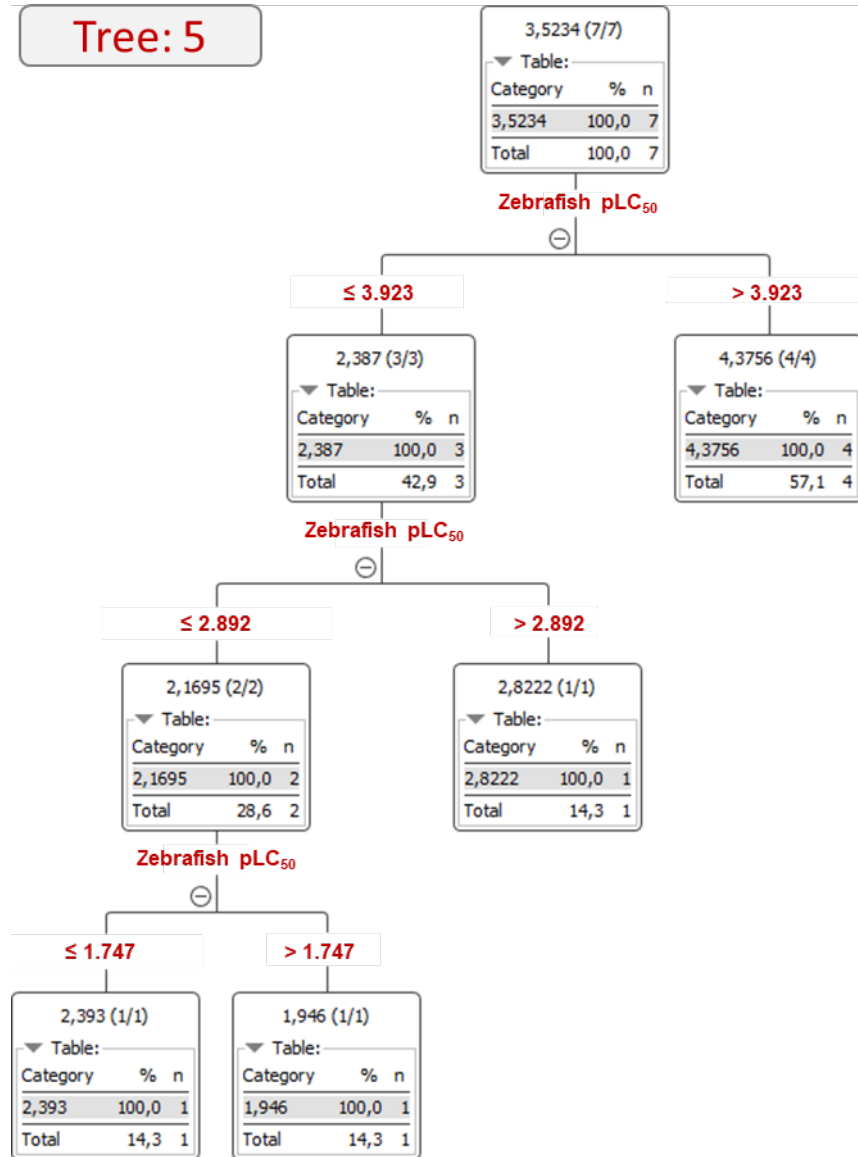
Tree: 3



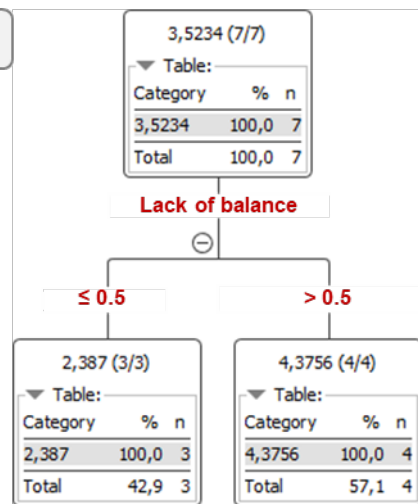
Tree: 4



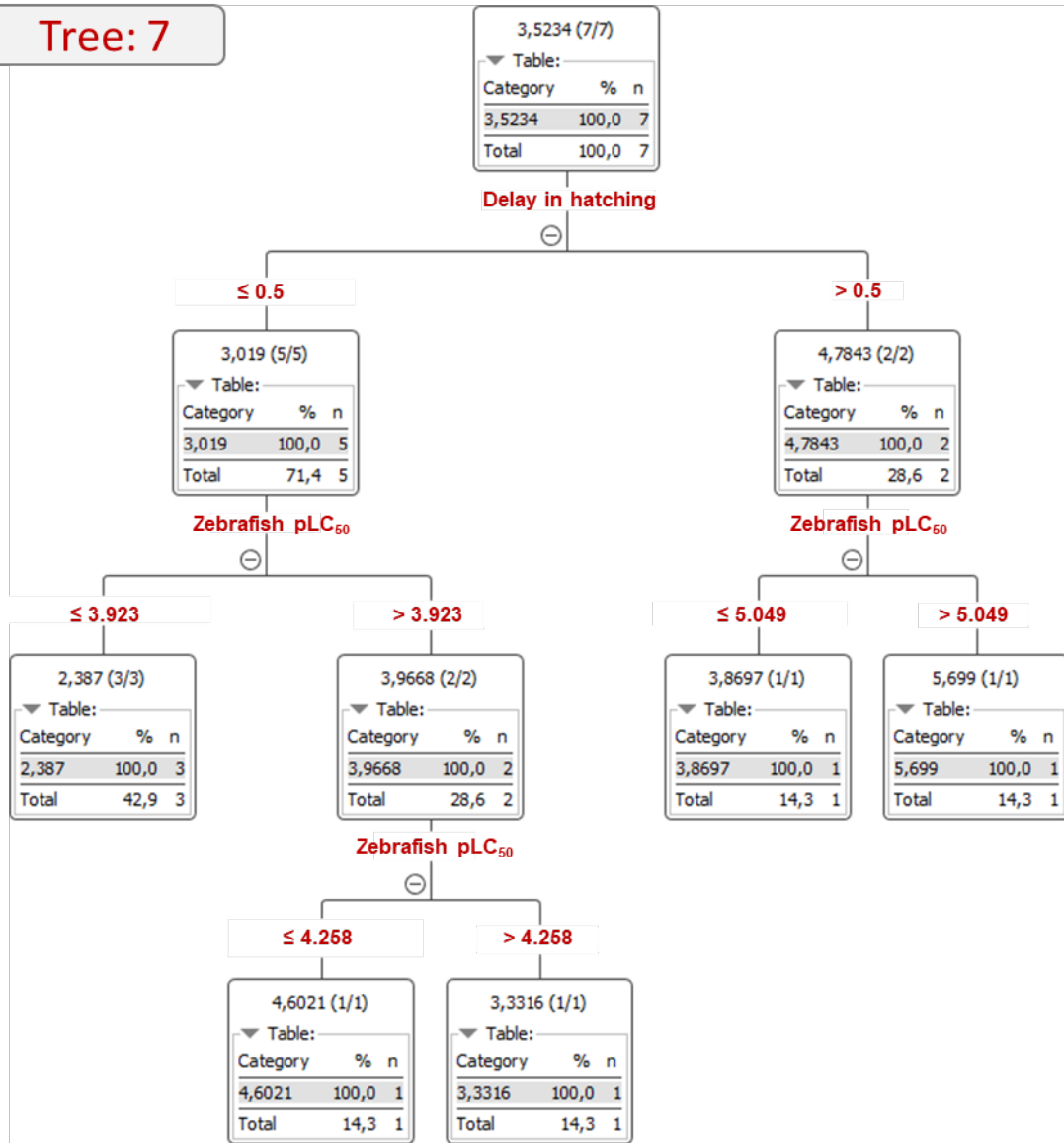
Tree: 5



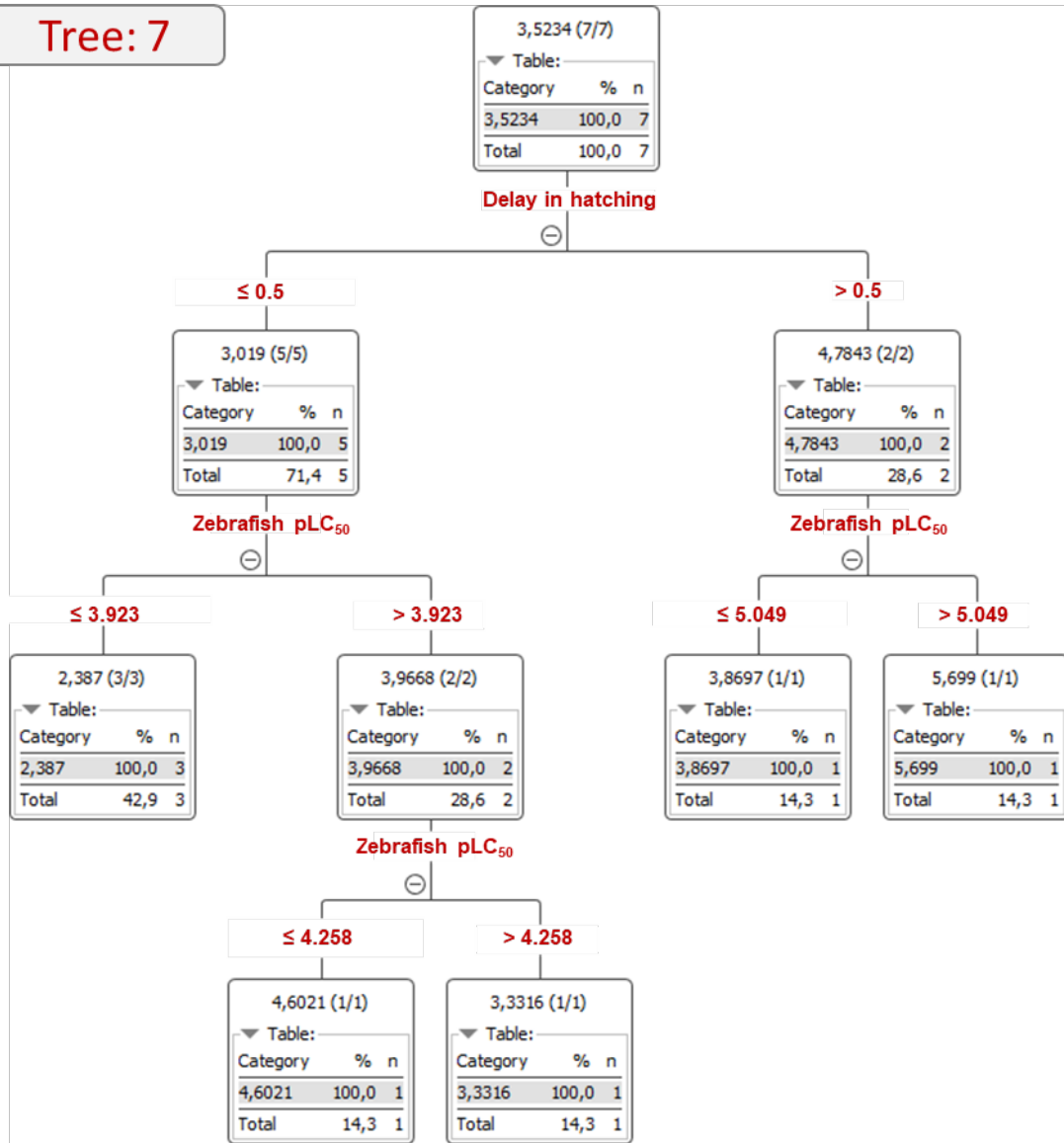
Tree: 6

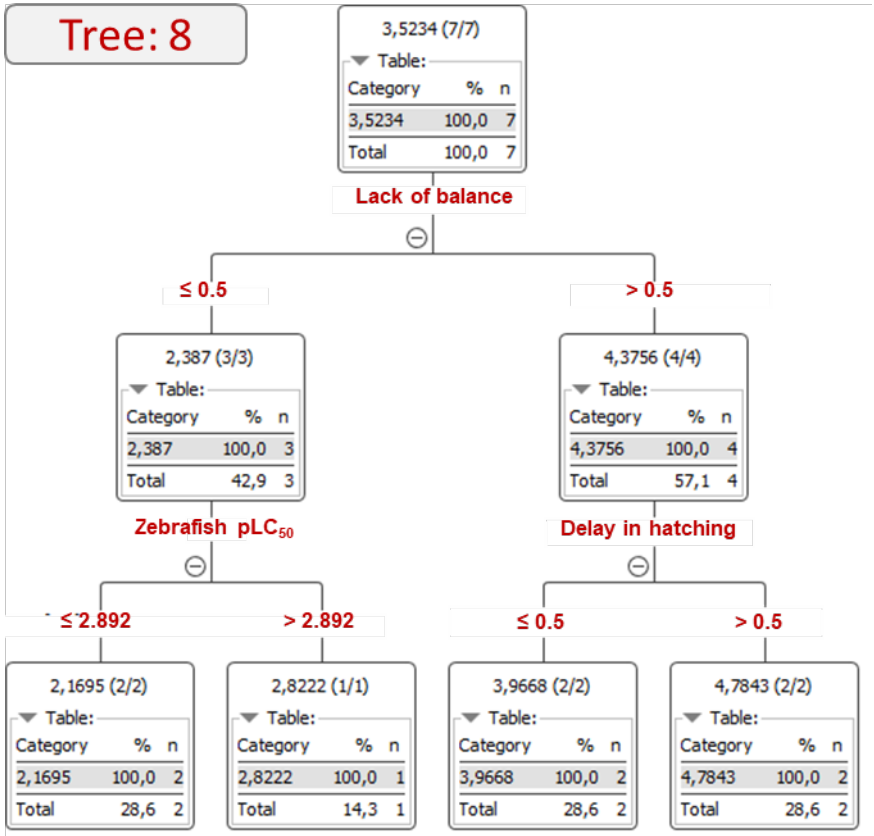


Tree: 7

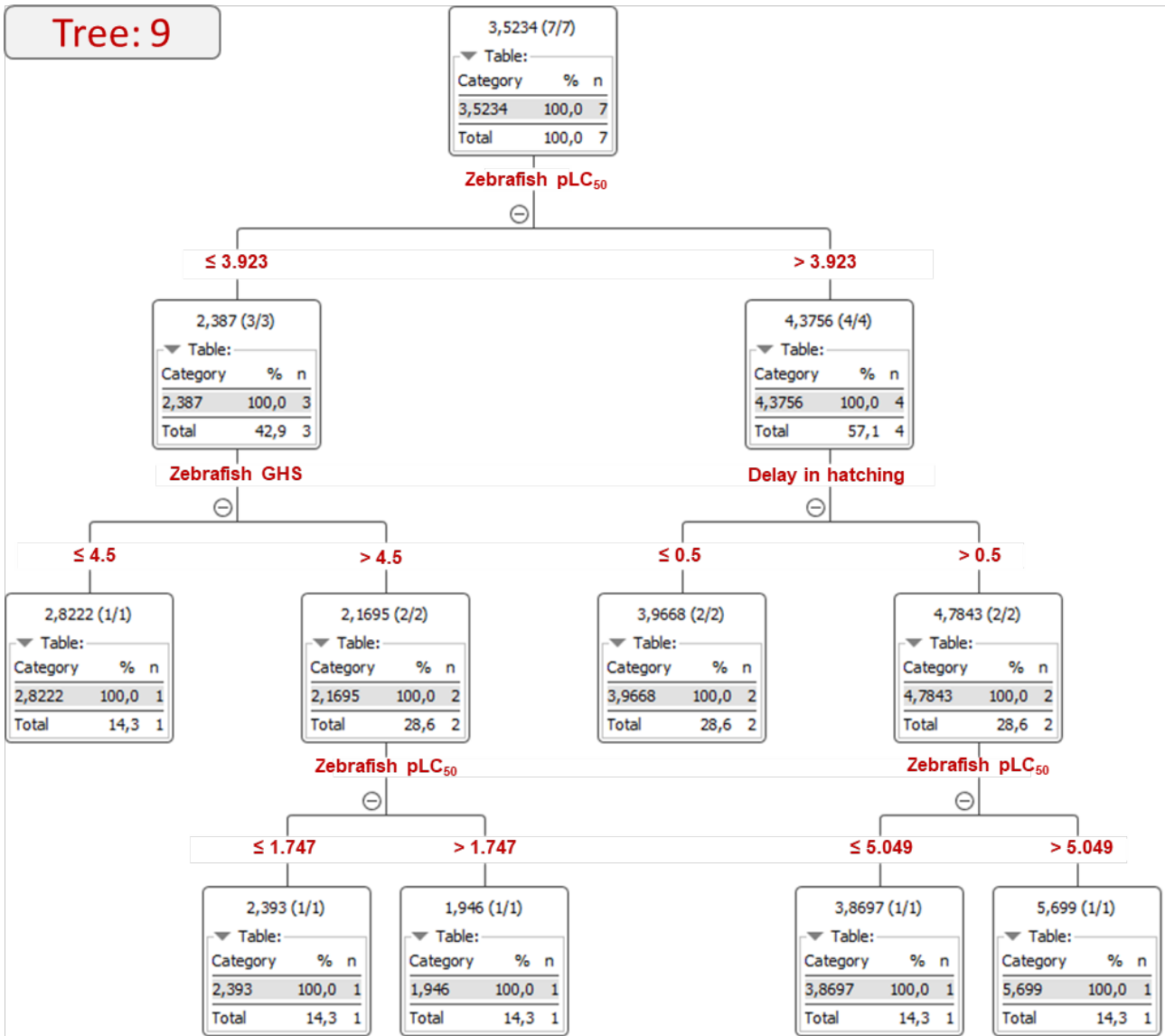


Tree: 7

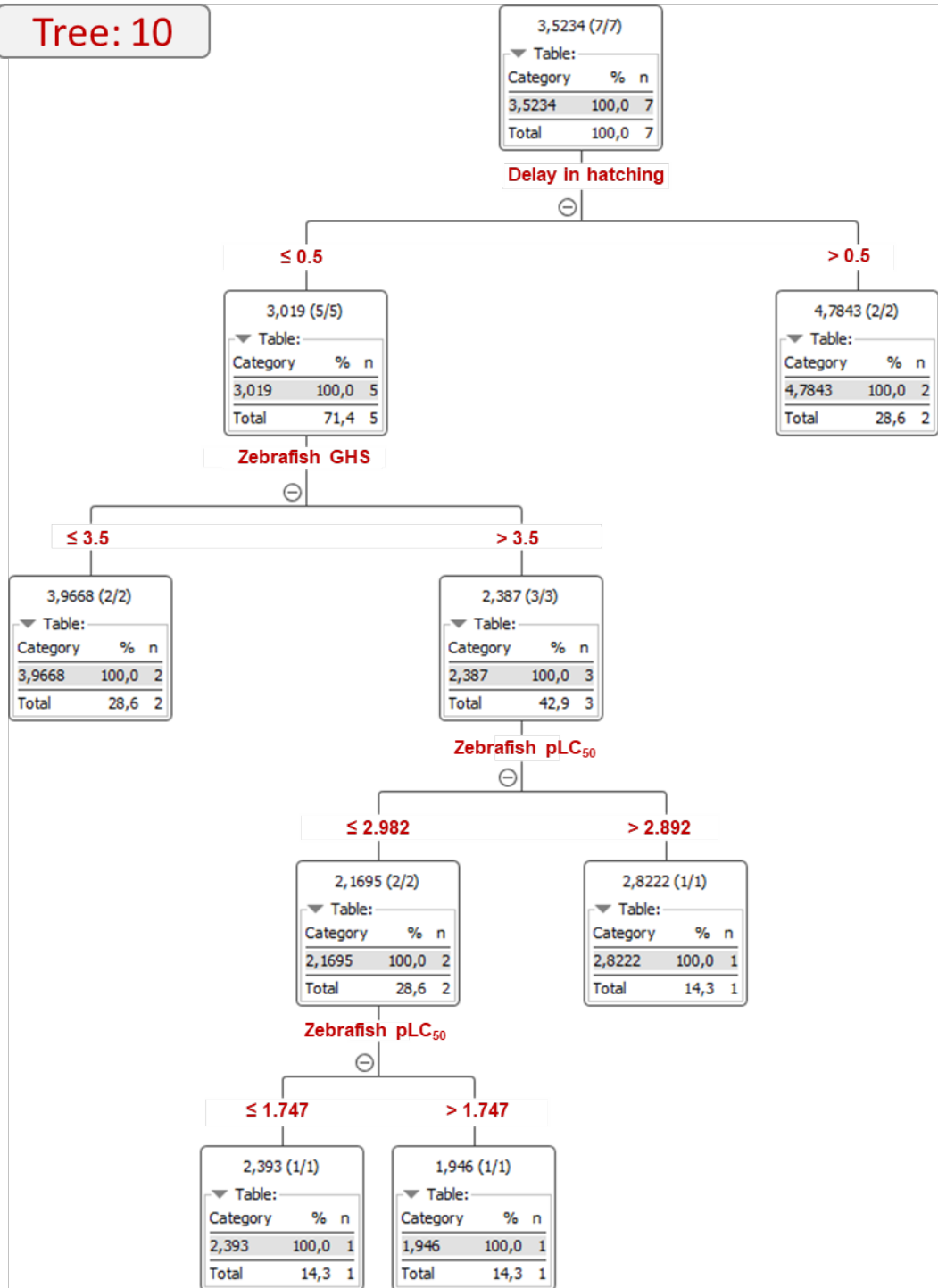




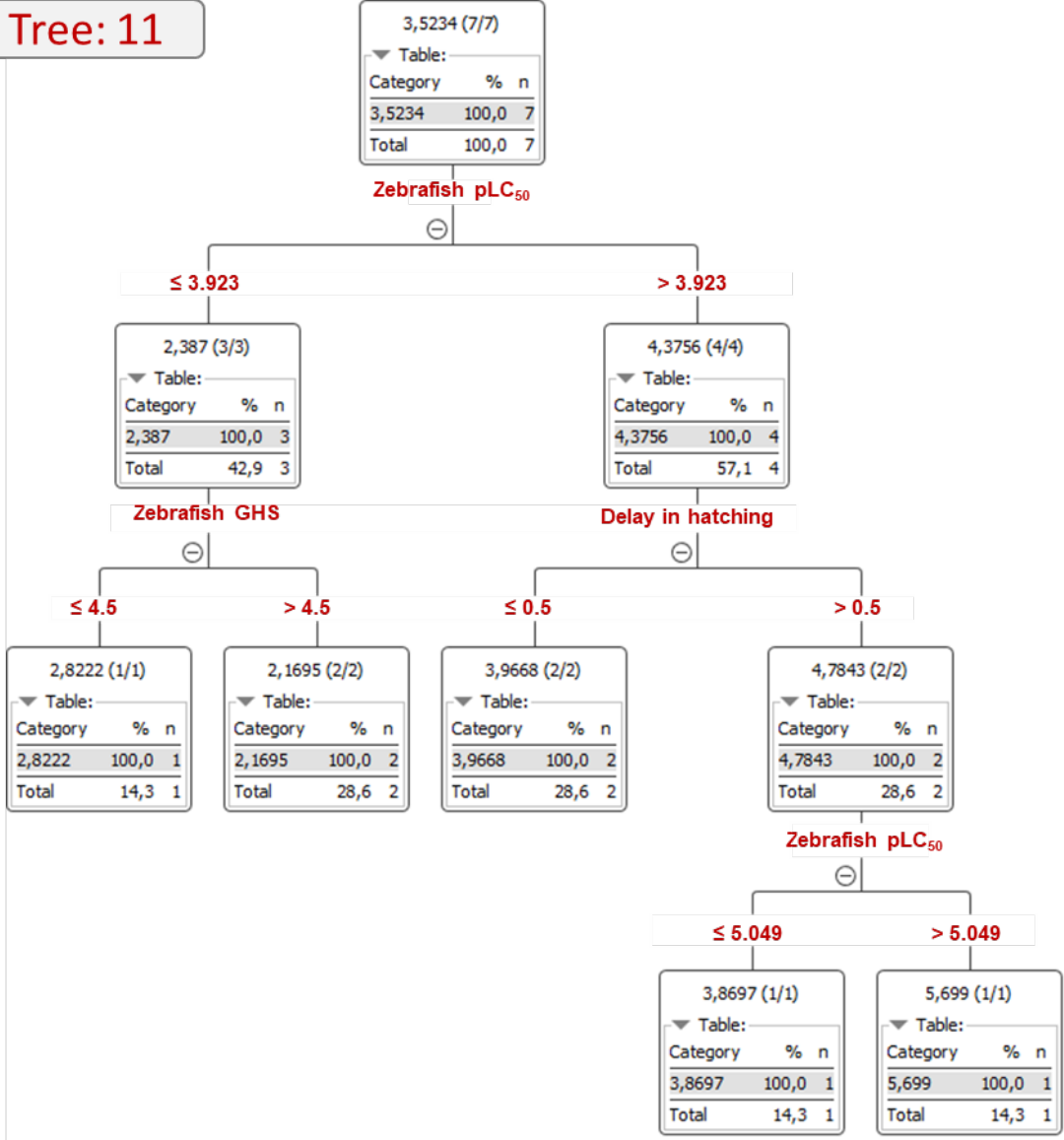
Tree: 9



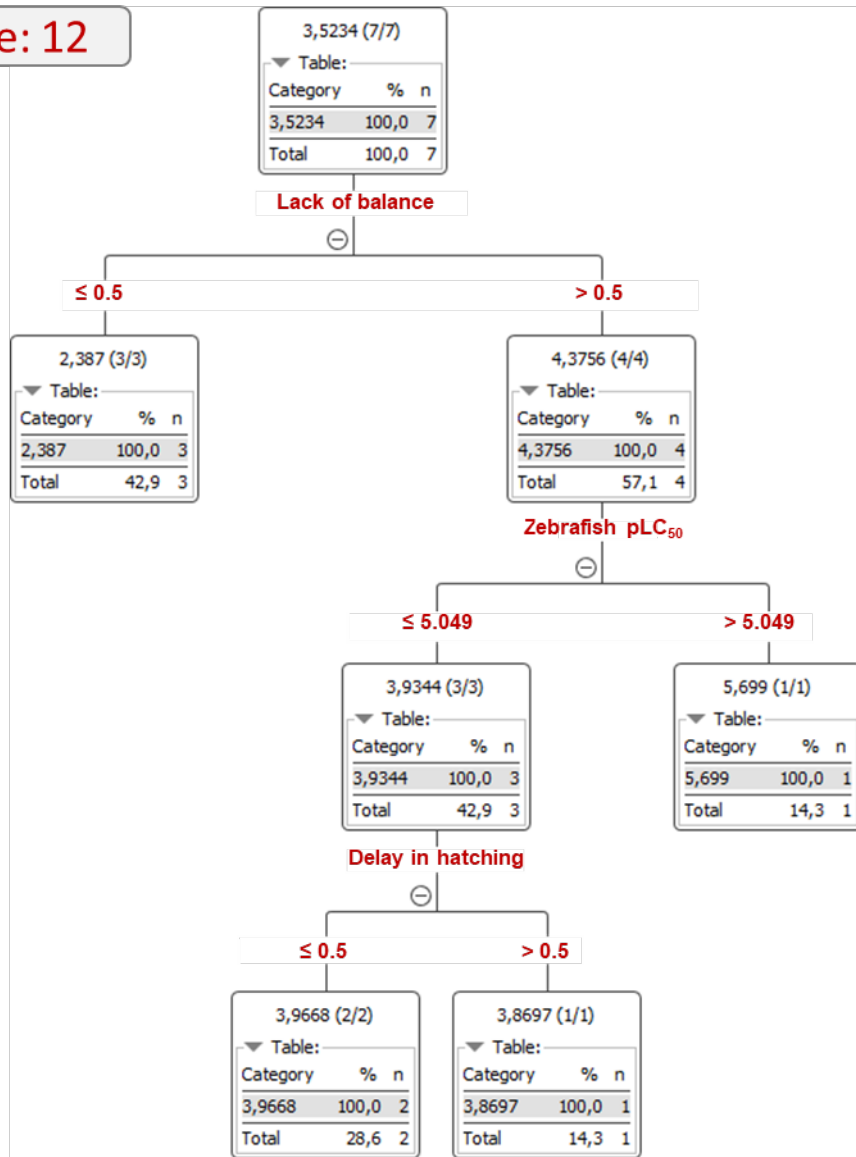
Tree: 10



Tree: 11



Tree: 12



Tree: 13

