



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

VINICIUS DE MEDEIROS ALVES

**ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS COMO MÉTODOS
ALTERNATIVOS PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO 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 nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

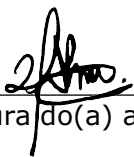
Nome completo do autor: Vinícius de Medeiros Alves

Título do trabalho: Estratégias Computacionais Como Métodos Alternativos Para Avaliação Da Sensibilização Cutânea

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo: Carolina Horta Andrade



Assinatura do(a) orientador(a)²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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

²A assinatura deve ser escaneada.

VINICIUS DE MEDEIROS ALVES

**ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS COMO MÉTODOS
ALTERNATIVOS PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Horta Andrade
Co-orientador: Prof. Dr. Alexander Tropsha
Co-orientador: Prof. Dr. Eugene Muratov

**Goiânia
2017**

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

Alves, Vinícius de Medeiros

Estratégias computacionais como métodos alternativos para avaliação da sensibilização cutânea [manuscrito] / Vinícius de Medeiros Alves. - 2017.

xv, 114 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Horta Andrade; co-orientador Dr. Alexander Tropsha; co-orientador Dr. Eugene Muratov.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Sensibilização cutânea humana. 2. QSAR. 3. Triagem virtual. 4. Pred-Skin. 5. Alertas estruturais químicos. I. Andrade, Carolina Horta, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
UFG/UFAM/UNIFAP/UFPA



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE

Aluno (a): Vinícius de Medeiros Alves

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Carolina Horta Andrade

Título da Dissertação: "Estratégias computacionais como métodos alternativos para avaliação da sensibilização cutânea".

Data: 12/05/2017

Horário: 13:30 horas

Local: Mini auditório da Faculdade de Farmácia/UFG

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Prof ^a . Dr ^a . Carolina Horta Andrade (FF/UFG) <i>Presidente</i>	<i>Aprovado</i>	<i>CH</i>
Prof ^a . Dr ^a . Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>Gisele A. Rodrigues Oliveira</i>
Prof ^a . Dr ^a Márcia Miguel Castro Ferreira (IQ-UNICAMP)	<i>Aprovado</i>	<i>Márcia</i>
Prof. Dr. Fernando Batista da Costa (FCFRP-USP)	<i>Aprovado</i>	<i>Fernando</i>
Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento (UNB)	<i>Aprovado</i>	<i>Paulo</i>
Prof ^a . Dr ^a . Melina Mottin (FF/UFG)		
Prof. Dr. Vinícius Barreto da Silva (PUC-GO)		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	<i>Aprovado</i>

Aos meus pais e minha irmã eu dedico este trabalho pelos exemplos de conduta moral, simplicidade e persistência; por todo esforço para me garantir oportunidades de seguir meus sonhos. Ao meu amor, Elisângela, pelo privilégio de compartilhar a mesma época e experiências neste mundo louco.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carolina Horta Andrade, pelo aprendizado, estímulo constante, confiança, suporte, orientação, amizade e infinitas oportunidades, meu eterno agradecimento.

Ao Dr. Rodolpho de Campos Braga, pelas orientações, discussões científicas, suporte, confiança e amizade.

Aos professores Drs. Alexander Tropsha e Eugene Muratov, pelo aprendizado, discussões, oportunidades e estímulo constante.

A todos colaboradores desse projeto.

A todos do LabMol, pelas discussões, amizade e por todo carinho em todos esses anos.

Ao (quase) Dr. Stephen Capuzzi, pelas contribuições, amizade e, principalmente, por me tirar do laboratório no meio da tarde para beber cerveja e falar sobre ciência.

Cheers!

A todos do MML-UNC, pelas discussões, apoio e pelos ótimos momentos, dentro e fora do lab.

Aos meus pais, Nivaldo e Neide, e minha irmã, Lívia, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e por acreditarem em mim.

Ao meu amor, Elisângela Côrtes, por todo companheirismo, amizade, compreensão e madrugadas regadas a cerveja e vinho. Obrigado pelo apoio incondicional e compreensão durante todo esse rolê. Obrigado por todas as qualidades que não caberiam aqui. Muito obrigado por revisar o texto desta tese.

Aos meus grandes amigos, simplesmente por serem meus amigos (e por todos os copos que essa amizade comporta!).

Aos meus gatos, Urso e Luciraldo (Luci), pela companhia marota durante (quase) todo tempo que trabalhei em casa.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFG.

Às agências de fomento: CAPES, pela bolsa de doutorado; FAPEG, pelo projeto que financiou boa parte do trabalho desenvolvido; e CNPq, pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“With insufficient data it is easy to go wrong.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS	III
EPÍGRAFE	IV
SUMÁRIO	V
TABELAS	VIII
FIGURAS	IX
ANEXOS	XI
SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Avaliação da segurança de compostos químicos	16
1.2 Métodos alternativos ao uso de animais	17
1.3 Estratégias computacionais para avaliação da toxicidade	18
1.3.1 Alertas estruturais.....	20
1.3.2 Relações quantitativas entre estrutura química e atividade.....	21
1.4 Sensibilização cutânea	24
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Parte I: sensibilização cutânea humana	31
3.1.1 Conjuntos de dados.....	32
3.1.1.1 <i>Sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A)</i>	32
3.1.1.2 <i>Sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados B)</i>	33
3.1.1.3 <i>Base dados da CosIng (Conjunto de Dados C)</i>	33
3.1.2 Preparo químico e biológico dos dados.....	34
3.1.3 Análise da concordância de dados de pele humana vs. dados de LLNA....	34
3.1.4 Abordagens de quimioinformática.....	35
3.1.4.1 <i>Análise de agrupamento hierárquico</i>	35
3.1.4.2 <i>Descritores moleculares</i>	35
3.1.4.3 <i>Algoritmo RBF-SCR</i>	36

3.1.4.4	<i>Geração dos modelos de QSAR</i>	37
3.1.4.5	<i>Mineração de texto</i>	38
3.2	Parte II: desenvolvimento de um aplicativo para web capaz de avaliar a sensibilização cutânea de compostos químicos	39
3.2.1	Conjuntos de dados	39
3.2.1.1	<i>Sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A)</i>	39
3.2.1.2	<i>Sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados D)</i>	39
3.2.2	Abordagens de quimioinformática.....	40
3.2.2.1	<i>Descritores moleculares</i>	40
3.2.2.2	<i>Geração dos modelos de QSAR</i>	41
3.2.2.3	<i>Random Forest</i>	41
3.2.2.4	<i>Implementação dos modelos e uso do aplicativo</i>	42
3.2.2.5	<i>Interpretação dos resultados</i>	43
3.3	Parte III: alertas estruturais	44
3.3.1	Contrastando previsões baseadas em alertas e QSAR.....	44
3.3.2	Aplicação da CBRA.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Parte I: Sensibilização cutânea humana	46
4.1.1	Análise de duplicados estruturais	46
4.1.1.1	<i>Sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A)</i>	46
4.1.1.2	<i>Sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados B)</i>	47
4.1.2	Análise da concordância de dados de pele humana vs. dados de LLNA....	47
4.1.3	Análise de agrupamentos hierárquicos	50
4.1.4	QSAR e LLNA na previsão de sensibilização cutânea humana	55
4.1.5	Otimização estrutural de compostos químicos.....	58
4.1.6	Triagem virtual de ingredientes encontrados em cosméticos	61
4.1.7	Considerações finais da parte I.....	62
4.2	Parte II: desenvolvimento de um aplicativo para web capaz avaliar a sensibilização cutânea de compostos químicos	63
4.2.1	Modelos de QSAR gerados para implementação no Pred-Skin	64
4.2.2	Interpretação dos resultados para otimização de compostos	66
4.2.3	Considerações finais da Parte II	67
4.3	Parte III: Alertas estruturais	67
4.3.1	Qual a confiabilidade de alertas estruturais para predizer a toxicidade?	68
4.3.2	Contrastando previsões baseadas em alertas e QSAR.....	69

4.3.3	Interpretando modelos de QSAR	73
4.3.4	Integrando QSAR e alertas estruturais	74
4.3.5	Considerações finais da Parte III	75
5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXOS	100

Tabela 1. Resultados experimentais binários de sensibilização cutânea humana vs. LLNA para 109 compostos com estrutura química definida.	48
Tabela 2. Resultados experimentais multiclassificatórios de sensibilização cutânea humana vs. LLNA para 109 compostos com a estrutura química definida.....	49
Tabela 3. Resumo da análise de agrupamentos, indicando o número de compostos corretamente preditos por QSAR e LLNA quando comparados com os dados humanos.....	52
Tabela 4. Dados de pele humana vs. LLNA vs. predições externas de QSAR dentro de grupos químicos selecionados.	53
Tabela 5. Características estatísticas dos resultados experimentais do LLNA vs. as predições externas dos modelos de QSAR (validação externa cruzada <i>5-fold</i>) para a predição de sensibilização cutânea humana.....	56
Tabela 6. Lista de compostos químicos preditos como sensibilizadores e confirmados na literatura.	61
Tabela 7. Características estatísticas de modelos de QSAR binários avaliada por validação cruzada externa <i>5-fold</i>	65
Tabela 8. Características estatísticas de modelos de QSAR multiclassificatórios avaliada por validação cruzada externa <i>5-fold</i>	66
Tabela 9. Comparação das precisões de predição dos modelos de QSAR, módulo de sensibilização cutânea do QSAR Toolbox e ToxAlerts.	70
Tabela 10. Exemplos de alertas estruturais e comparação dos efeitos experimentais e preditos de sensibilização cutânea para compostos contendo alerta.....	72

Figura 1. Esquema comparativo de avaliações baseadas em alertas estruturais predições baseadas em QSAR. Alertas estruturais são derivados de pequenos conjuntos de dados e utilizados em métodos comparativos de análogos químicos por interpolação para sinalizar compostos perigosos. Modelos de QSAR são desenvolvidos a partir de conjuntos de dados maiores e usados para fazer predições categóricas e quantitativas da toxicidade de um composto.....	20
Figura 2. Esquema representando a geração de um modelo de QSAR (modificado de TROPSHA, 2010). PLS: <i>partial least squares</i> ; MLR: <i>multiple linear regression</i> ; NN: <i>neural networks</i> ; SVM: <i>Support vector machine</i> ; RF: <i>random forest</i> ; DL: <i>deep learning</i>	22
Figura 3. Via de efeito adverso da sensibilização da pele, modificado de Karlberg et al. (2008) e OECD (2012).....	25
Figura 4. Fluxo de trabalho para desenvolvimento dos modelos de QSAR (modificado de Tropsha (2010). QNA: <i>Quantitative Neighborhoods of Atoms</i> ; PASS: <i>Prediction of Activity Spectra of Substances</i>	32
Figura 5. Representação geral para o uso e interpretação dos resultados do aplicativo Pred-Skin.....	43
Figura 6. Comparação entre DSA ₀₅ humano e o EC3 de LLNA para todos os 52 sensibilizadores ($y = 0.3111x + 0,8259$; $R^2 = 0,08$) — painel esquerdo; e 49 sensibilizadores ($y = 2,961 + 1.4383x$; $R^2 = 0,05$) permaneceram após a exclusão de três medidas extremas (lilial, piridina, e benzoato de fenila) — painel direito.	49
Figura 7. Os resultados da análise de cluster de 109 compostos com dados de sensibilidade da pele humanos. (A) Mapa de calor e (B) dendrograma da matriz de distância, ambos de cor de acordo com a similaridade estrutural (azul / violeta = similar; amarelo / vermelho = diferente).	51
Figura 8. (A) Sítio mais provável de acetilcisteínação da 3,4-dihidrocumarina representado em vermelho. (B) Metabólito da 3,4-dihidrocumarina com um resíduo de cisteína.	55

Figura 9. Exemplo de transformação estrutural da sensibilidade de pele humana do benzoato de fenila em vários não-sensibilizadores utilizando modelos de QSAR desenvolvidos.....	59
Figura 10. Exemplo de interpretação de modelos de QSAR colorida de acordo com as contribuições de átomos em mudança do potencial de sensibilização: vermelho – aumento de sensibilização; azul – diminuição de sensibilização; verde – nenhuma contribuição significativa. Setas verdes representam maior confiança da predição. Essa informação ajuda a orientar a transformação estrutural da sensibilidade cutânea humana do benzoato de fenila em vários não-sensibilizadores (ver Figura 9).....	60
Figura 11. Planejamento de compostos potencialmente menos tóxicos usando o Pred-Skin. A partir de um composto sensibilizador (A), com dados experimentais em seres humanos, o usuário faz predições de compostos análogos que carecem de dados experimentais. Quando os modelos baseados em dados humanos e LLNA concordam (B-C), há uma maior confiança das predições do que quando eles discordam (D). Caso os modelos discordem, aquele baseado em dados humanos devem ser priorizados.	66
Figura 12. Representação gráfica da aplicação de CBRA para o eugenol (sensibilizador). O nó central representa o composto alvo (eugenol) rodeado por vizinhos biológicos (lado esquerdo) e químicos (lado direito). A similaridade de Tanimoto é utilizada para posicionar os vizinhos para o composto alvo. Bordas e nós são coloridas de acordo com a classificação da atividade conhecida (vermelho = tóxico, verde = não-tóxico).	75
Figura 13. Proposta de abordagem integrada para a avaliação da toxicidade de novas substâncias através da combinação de alertas estruturais e modelos de QSAR.....	76

Tabela A1. Lista completa dos compostos químicos e dados experimentais de sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A) e murina (LLNA, Conjunto de dados B).	100
Tabela A2. Número de registros, resultados de ensaios e predições de QSAR para as 62 substâncias com vários registros presentes no conjunto de dados sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A).	106
Tabela A3. Número de registros, resultados dos experimentos para as 19 substâncias com diferentes anotações entre os registros presentes no conjunto de dados sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados B).	109
Tabela A4. Resultados experimentais do LLNA, predições de QSAR, predições do modelo combinado de LLNA e QSAR e grupo correspondente para cada molécula.	110

SIGLAS E ABREVIATURAS

CAS	<i>Chemical Abstract Services.</i>
CBRA	<i>Chemical Biological Read-Across.</i>
CosIng	<i>European Commission database with information on cosmetic ingredients.</i>
DA	Domínio de aplicabilidade.
DL	<i>Deep learning.</i>
DSA ₀₅	Dose por área de pele que produz uma resposta positiva em 5% da população testada.
EC3	Concentração necessária para produzir um índice de estímulo ≥ 3 em camundongos, ou seja, um aumento de três vezes no número de linfócitos quando comparado ao grupo controle.
FP	Número de falsos positivos.
FN	Número de falsos negativos.
HiT QSAR	<i>Hierarchical QSAR technology.</i>
HMT	<i>Human maximization test.</i>
HRIPT	<i>Human repeat-insult patch test.</i>
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.</i>
LLNA	<i>Local lymph node assay.</i>
LOEL	<i>Lowest observed effect level.</i>
NN	<i>Neural networks.</i>
NOEL	<i>No observed effect level.</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development.</i>
OOB	<i>Out-of-bag.</i>
PASS	<i>Prediction of activity spectra of substances.</i>
PLS	<i>Partial least squares.</i>
QNA	<i>Quantitative neighborhoods of atoms.</i>
QSAR	<i>Quantitative-structure-activity relationship.</i>
RBF-SCR	<i>Radial basis function with self-consistent regression.</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals.</i>
RF	<i>Random forest.</i>

MLR	<i>Multiple linear regrerssion.</i>
rLLNA	<i>Reduced local lymph node assay.</i>
SAR	<i>Structure-activity relationship.</i>
SiRMS	<i>Simplex Representation of Molecular Structure.</i>
SMILES	<i>Simplified molecular-input line-entry system.</i>
SVM	<i>Support vector machine.</i>
TCC	Taxa de classificação correta.
VP	Número de verdadeiros positivos.
VPN	Valor de predividade negativa.
VPP	Valor de predividade positiva.
VN	Número de verdadeiros negativos.

Introdução: A sensibilização cutânea é um importante parâmetro de avaliação de toxicidade humana e ambiental. Embora muitos compostos tenham sido avaliados em seres humanos, não foi reportado até o momento modelos de QSAR (do inglês, *quantitative structure-activity relationships*) gerados com esses dados. Comumente, a sensibilização cutânea é avaliada computacionalmente usando-se alertas estruturais. No entanto, tem havido uma preocupação crescente de que alertas sinalizam a maioria dos compostos como tóxicos, o que questiona sua confiabilidade como marcadores de toxicidade. O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver e aplicar novos métodos de quimioinformática para prever a sensibilização cutânea de compostos químicos que carecem de dados experimentais. **Metodologia:** Foram compilados, preparados, analisados e comparados os dados de sensibilização cutânea de pele humana e do modelo animal murino (realizado em camundongos), denominado LLNA (*local lymph node assay*). Modelos de QSAR foram desenvolvidos utilizando esses dados e aplicados para a triagem de quimiotecas virtuais para identificar potenciais sensibilizadores. Foi desenvolvido um aplicativo gratuito para a identificação de potenciais sensibilizadores cutâneos. Além disso, foi demonstrado que modelos de QSAR podem ser usados para identificar subestruturas químicas estatisticamente significativas (alertas estruturais baseados em QSAR) que influenciam a toxicidade. **Resultados e discussão:** A concordância global (R) entre respostas de sensibilização cutânea humana e murina para um conjunto de 135 substâncias químicas únicas foi baixa (R = 28-43%), embora várias classes químicas apresentassem alta concordância. Foi possível desenvolver modelos de QSAR preditivos com taxa de classificação correta externa de 71%. Um modelo de consenso que integrava previsões concordantes de QSAR e dados de LLNA proporcionaram uma acurácia 82%. Utilizou-se os modelos de QSAR desenvolvidos para a triagem virtual da base de dados CosIng e foram identificados 1061 potenciais sensibilizadores cutâneos. Para dezessete desses compostos, encontrou-se evidências publicadas de seus efeitos de sensibilização cutânea em seres humanos. O aplicativo desenvolvido, Pred-Skin (<http://www.labmol.com.br/predskin/>), baseia-se em modelos de QSAR classificatórios de dados humanos (109 compostos) e murinos (515 compostos) com boa taxa de classificação correta externa (70-81% e 72-84%, respectivamente). Esse aplicativo também possui um modelo de multiclassificador desenvolvido com dados de LLNA (precisão que varia entre 73-76%). **Conclusões:** Os modelos de QSAR desenvolvidos forneceram uma alternativa mais precisa do que o modelo animal para avaliação da sensibilização cutânea humana. Além disso, a interpretação dos modelos de QSAR permitem orientar a otimização estrutural de compostos tóxicos para reduzir o potencial de toxicidade. O aplicativo Pred-Skin é uma ferramenta rápida, confiável e de fácil utilização para a avaliação da sensibilização cutânea de compostos químicos. Foi também proposta uma nova abordagem que integra sinergicamente alertas estruturais e modelos de QSAR rigorosamente validados para uma avaliação de toxicidade mais transparente e precisa de novos produtos químicos.

Palavras-chave: Sensibilização cutânea humana, QSAR, triagem virtual, Pred-Skin, aplicativo para web, alertas estruturais químicos.

Introduction: Skin sensitization is a major environmental and human health hazard. Although many chemicals have been evaluated in humans, there have been no efforts to model these data to date. Skin sensitization is commonly evaluated using structural alerts. However, there has been a growing concern that alerts disproportionately flag too many chemicals as toxic, which questions their reliability as toxicity markers. The main goal of this thesis was to develop and apply new cheminformatics methods to predict skin sensitization of chemical compounds that lack experimental data.

Methodology: It has been compiled, curated, analyzed, and compared the available human data and the murine (performed in mice) animal model data, named LLNA (local lymph node assay). Using these data, it was developed reliable computational models and applied them for virtual screening of chemical libraries to identify putative skin sensitizers. It was developed a freely accessible web-based application for the identification of potential skin sensitizers. In addition, it was demonstrated that contrary to the common perception of QSAR models as “black boxes” they can be used to identify statistically significant chemical substructures (QSAR-based alerts) that influence toxicity. **Results and discussion:** The overall concordance between murine LLNA and human skin sensitization responses for a set of 135 unique chemicals was low ($R = 28-43\%$), although several chemical classes had high concordance. We have succeeded to develop predictive QSAR models of all available human data with the external correct classification rate of 71%. A consensus model integrating concordant QSAR predictions and LLNA results afforded a higher correct classification rate of 82% but at the expense of the reduced external dataset coverage (52 %). We used the developed QSAR models for virtual screening of CosIng database and identified 1,061 putative skin sensitizers; for seventeen of these compounds, we found published evidence of their skin sensitization effects. The developed Pred-Skin web app (<http://www.labmol.com.br/predskin/>) is based on binary QSAR models of human (109 compounds) and LLNA (515 compounds) data with good external correct classification rate (70-81% and 72-84%, respectively). It is also included a multiclass potency model based on LLNA data (accuracy ranging between 73-76%). **Conclusions:** Models reported herein provide more accurate alternative to LLNA testing for human skin sensitization assessment across diverse chemical data. In addition, they can also be used to guide the structural optimization of toxic compounds to reduce their skin sensitization potential. The Pred-Skin web app is a fast, reliable, and user-friendly tool for early assessment of chemically-induced skin sensitization. A new approach that synergistically integrates structural alerts and rigorously validated QSAR models for a more transparent and accurate safety assessment of new chemicals was also proposed.

Keywords: Human skin sensitization, QSAR, virtual screening, Pred-Skin, web app, structural alerts.

1.1 Avaliação da segurança de compostos químicos

Diariamente, seres humanos estão expostos a uma inimaginável variedade de substâncias naturais e sintéticas que jamais foram avaliadas em protocolos toxicológicos. De fato, as informações referentes aos riscos que tais compostos químicos representam para a saúde humana e o meio ambiente são limitadas e muitas vezes inadequadas, inclusive para compostos com alto volume de produção (MUIR; HOWARD, 2006; CHUPRINA et al., 2010; EGEGHY et al., 2012). Existe, atualmente, uma crescente pressão política e pública para se garantir que compostos químicos perigosos sejam identificados e substituídos por alternativas "mais verdes", ou seja, mais seguras e biodegradáveis (COLLINS, 2003; SCHULTE et al., 2013).

No processo de avaliação da segurança de compostos químicos, analisa-se os riscos decorrentes de produção e/ou utilização com base em todas as informações referentes já disponíveis. Essa avaliação inclui riscos para a saúde humana, riscos ambientais e dados de biodegradação e biomagnificação. Tal procedimento mostra-se necessário não apenas para novos compostos, mas também para todos aqueles que carecem de dados experimentais (ECHA, 2009).

A avaliação da segurança é, indubitavelmente, um ponto prioritário dentro do processo de planejamento e desenvolvimento de fármacos. Com efeito, a maioria dos fármacos que entram em fase clínica sequer chega ao mercado, sendo aproximadamente 50% devido à falta de eficácia, 25% por alta toxicidade e 15% por outra razão (PLENGE; SCOLNICK; ALTSHULER, 2013). Basicamente, tais falhas decorrem da falta de correspondência total entre os modelos animais e a realidade biológica do organismo humano, muitas vezes associada à variabilidade genética humana (MAGGIORA, 2011).

A avaliação de efeitos tóxicos em animais ainda é considerada essencial para garantir a futura segurança de um composto químico em seres humanos (MANGIPUDY; BURKHARDT; KADAMBI, 2014). Contudo, tem se revelado que diversos modelos animais não são confiáveis para extrapolar os resultados e conclusões para os seres humanos (GREEK; MENACHE, 2013). Além disso, o uso

de animais em laboratório tem recebido muitas críticas, as quais o consideram antiético e exorbitantemente caro (BURDEN; SEWELL; CHAPMAN, 2015).

1.2 Métodos alternativos ao uso de animais

Historicamente, a avaliação da segurança e eficácia de produtos para uso em seres humanos (produtos químicos, dispositivos médicos, fármacos, cosméticos, *etc.*) tem sido feita através do uso de animais (JĘDRZEJEWSKA, 2014) e, por consequência, é notório que a sociedade tenha tolerado cada vez menos o uso de animais em laboratório (AZIZ; STEIN; YOGESHWAR, 2011). Como exemplo, a experimentação animal para produtos cosméticos já é proibida na União Europeia desde 2003 (EUROPEAN UNION, 2003), sendo que em 2009 proibiu-se a venda de produtos cosméticos assim testados, com exceção de propriedades mais complexas, como toxicidade de dose repetida, toxicidade reprodutiva e toxicocinética (EUROPEAN UNION, 2009). Em 2013, o impedimento estendeu-se para a todas as propriedades e a comercialização de produtos cosméticos e ingredientes testados em animais, mesmo fora da Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2013).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2015 uma resolução que permite que métodos alternativos ao uso de animais, já reconhecidos no país pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sejam suficientes para pedidos de registro de medicamentos, cosméticos, produtos para saúde, produtos de limpeza, entre outros produtos (ANVISA, 2015). Atualmente, existem 24 métodos alternativos aprovados pelo CONCEA (MCTI, 2014; CONCEA, 2016). Entre estes, citam-se testes para avaliar irritação da pele, irritação ocular, toxicidade aguda e testes já validados pela OECD para sensibilização cutânea (ver item 1.4). De acordo com o Parecer nº 838 do MCTI, propriedades que tenham métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA não poderão mais ser avaliadas em animais a partir de 2019 (MCTI, 2014).

Nos últimos anos, estudos têm apresentado evidências de baixa relevância científica para diversos ensaios que usam animais (HARTUNG, 2013; BAILEY; THEW; BALLS, 2014). De fato, o acúmulo de dados experimentais tem revelado que alguns métodos alternativos (p. ex., teste de carcinogenicidade *in vitro*) apresentam melhor reprodutibilidade do que modelos animais (HARTUNG, 2016). Os testes de toxicidade no século XXI estão se movendo em direção a uma maior compreensão das vias de efeito adverso das doenças em vários níveis biológicos para se

desenvolver métodos alternativos (ADLER et al., 2011; BISHOP et al., 2012; LANGLEY et al., 2015).

Apesar de promissora, essa transição é um desafio. É provável que um único método alternativo não seja suficiente para se avaliar a toxicidade de compostos químicos (LOMBARDO et al., 2014). Essa realidade decorre da complexidade da via de efeito adverso de propriedades toxicológicas. A via de efeito adverso é a sequência de respostas biológicas que se inicia com os eventos moleculares e que leva a uma resposta adversa *in vivo* (WATANABE et al., 2011). O conhecimento dessa via possibilita desenvolver métodos *in vitro* de alto rendimento e qualidade, potencialmente através do uso de células ou tecidos humanos, que são empregados com o fim de se obter uma caracterização compreensiva do risco relativo aos seres humanos (DAVIS et al., 2013).

A combinação de diferentes ensaios individuais e sua avaliação em grupo é denominada Estratégia de Ensaio Integrada. Essas estratégias permitem aumentar significativamente a utilização de informações para a tomada de decisões e, assim, minimizar a necessidade de ensaios com animais. Para esse efeito, são desenvolvidos, testados e divulgados procedimentos operacionais que orientam uma avaliação transparente e cientificamente adequada das substâncias químicas de uma forma orientada para a propriedade avaliada em questão (ROVIDA et al., 2015).

Apesar de serem decisivamente promissores e solucionarem o impasse da ética referente ao uso de animais em laboratório, os métodos *in vitro* não resolvem o problema dos custos (HARTUNG; DASTON, 2009). Em 2006, a União Europeia aprovou uma lei designada de REACH (do inglês, *Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*) que obriga os fabricantes a fornecer informações detalhadas sobre os produtos químicos que são fabricados, comercializados ou importados em escala de mais de 1 tonelada por ano na Europa (EUROPEAN UNION, 2007). Avaliar experimentalmente todos esses compostos é insustentável tanto financeiramente quanto experimentalmente (BURDEN; SEWELL; CHAPMAN, 2015). Como alternativa, métodos *in silico* podem ser úteis na avaliação de substâncias nunca avaliadas experimentalmente (LUSHINGTON, 2014).

1.3 Estratégias computacionais para avaliação da toxicidade

Métodos computacionais têm sido reconhecidos como alternativas confiáveis, rápidas e de baixo custo para a avaliação da toxicidade de produtos químicos durante

os primeiros estágios de desenvolvimento de fármacos ou avaliação da toxicidade ambiental (NAVEN; LOUISE-MAY, 2015). Existem várias estratégias computacionais utilizadas para a avaliação de propriedades biológicas, comumente divididas em dois tipos: (i) baseada na estrutura (do receptor) e (ii) baseada no ligante (YOUNG, 2009).

No primeiro tipo de estratégia, a estrutura de proteínas-chave envolvidas no processo toxicológico precisa ser elucidada. A elucidação estrutural dessas proteínas co-cristalizadas com substratos ou ligantes permite analisar a interação de potenciais ligantes através do processo de complementaridade molecular (estéreo/eletrostática) (MOHAN, 2011). Caso a proteína-chave não tenha estrutura elucidada, é possível desenvolver um modelo por homologia. Nesse caso, um modelo tridimensional dessa proteína é gerado a partir da sua sequência primária de aminoácidos e uma proteína homóloga que tenha estrutura determinada experimentalmente (BORDOLI et al., 2008). A abordagem baseada na estrutura do receptor é importante principalmente para prever o(s) modo(s) de ligação de um ligante/inibidor com a proteína. Essa informação contribui significativamente para o planejamento de compostos com propriedades otimizadas (ELOKELY; DOERKSEN, 2013).

Para a avaliação de toxicidade, métodos baseados em ligantes têm sido mais utilizados, o que se deve tanto à falta de informações sobre alvos envolvidos quanto à maior facilidade de se implementar métodos de aprendizado de máquina em triagem virtual de grandes conjuntos de dados (SCHOMBURG; RAREY, 2014; EKINS, 2014). As estratégias baseadas nos ligantes levam em consideração as características multifuncionais dos ligantes já conhecidos no processo sob investigação. Em toxicologia, usa-se principalmente alertas estruturais, agrupamentos químicos, métodos comparativos de análogos químicos por interpolação (do inglês, *read-across*) (ver item 1.3.1) e modelos de QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationships*) (Figura 1).

O uso de métodos computacionais em toxicologia tornou-se um conceito importante tanto na avaliação de toxicidade quanto no apoio a decisões regulatórias desde a aprovação da REACH, que recomenda que os produtos químicos sejam avaliados principalmente por métodos alternativos, incluindo abordagens computacionais (EUROPEAN UNION, 2007). Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental tem utilizado métodos computacionais para apoiar o peso de evidência na avaliação dos riscos de substâncias químicas (ECHA, 2014).

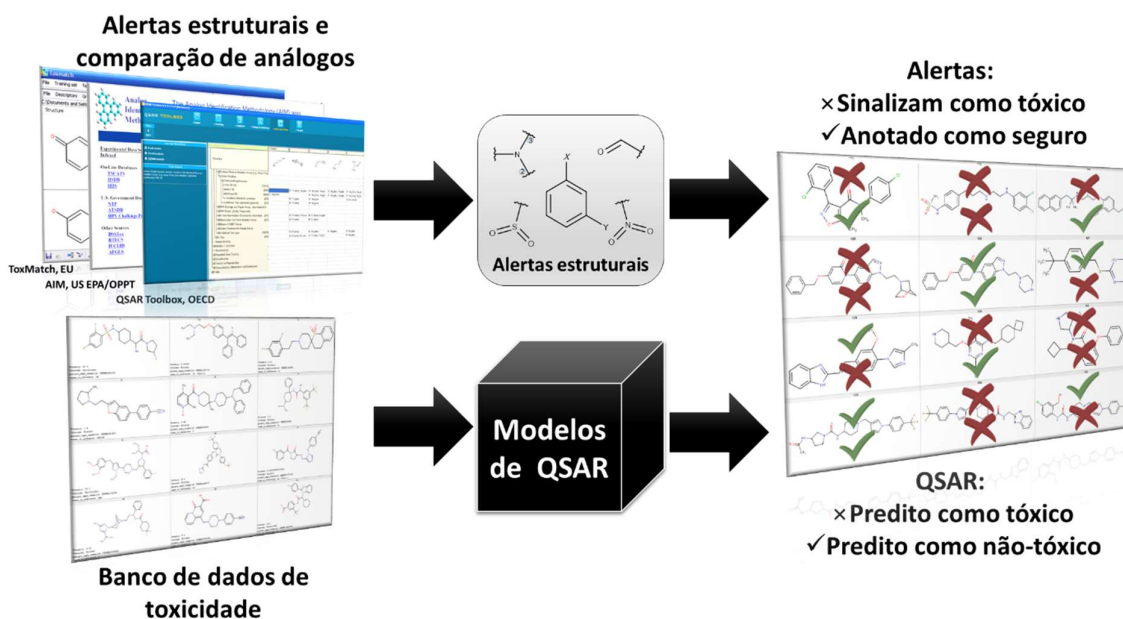


Figura 1. Esquema comparativo de avaliações baseadas em alertas estruturais e previsões baseadas em QSAR. Alertas estruturais são derivados de pequenos conjuntos de dados e utilizados em métodos comparativos de análogos químicos por interpolação para sinalizar compostos perigosos. Modelos de QSAR são desenvolvidos a partir de conjuntos de dados maiores e usados para fazer previsões categóricas e quantitativas da toxicidade de um composto.

1.3.1 Alertas estruturais

Alertas estruturais (OECD, 2009a) são subestruturas moleculares que estão associados com determinada propriedade da molécula (BLAGG, 2010). Comumente, alertas baseiam-se no conhecimento humano e são destinados a entender a base química do mecanismo de ação, ou, pelo menos, o evento molecular iniciante no caso de propriedades mais complexas (ALLEN et al., 2014).

Os alertas são usados para sinalizar compostos potencialmente tóxicos e agrupar compostos em categorias para propiciar a comparação de análogos químicos por interpolação (Figura 1) (ECHA, [s.d.]; ENOCH; ROBERTS, 2013). Esse procedimento compreende o preenchimento de dados usado para avaliar certo efeito de um composto químico (ou grupo de compostos químicos), utilizando dados de moléculas consideradas estruturalmente similares (CRONIN, 2013a). Tais métodos ganharam aceitação entre os toxicologistas devido à sua simplicidade, transparência e facilidade de interpretação (CRONIN, 2013b). No entanto, embora a comparação de análogos venha sendo aceita no âmbito das agências regulatórias, há observações

no sentido de que tal abordagem é propensa a apresentar resultados tendenciosos (STEPAN et al., 2011; ALVES et al., 2015a; LIU; YU; WALLQVIST, 2015; LOW et al., 2015).

Abordagens qualitativas, como alertas, agrupamentos químicos e comparação de análogos por interpolação, foram incorporadas em vários sistemas informatizados, muitas vezes empregando camadas adicionais de efeitos de modulação secundárias ao redor de cada alerta (p. ex., QSAR Toolbox (OECD, 2014), OCHEM ToxAlerts (SUSHKO et al., 2012), Lhasa's Derek (RIDINGS et al., 1996), etc.). Ademais, tendo em vista que a análise e processamento de grandes volumes de dados experimentais por especialistas humanos pode ser muito lenta, os sistemas computacionais baseados em “regras de especialistas” costumam usar métodos estatísticos para descobrir subestruturas fortemente associados com a propriedade em estudo. As subestruturas preditas por esses sistemas são revisadas e preparadas por especialistas na área para fornecer a interpretação mecanística.

1.3.2 Relações quantitativas entre estrutura química e atividade

As bases dos estudos de QSAR surgiram na década de 1960, com um estudo inovador publicado por Hansch e colaboradores (1962). Nesses mais de 50 anos de história, os modelos de QSAR se popularizaram e diversificaram, evoluindo da aplicação em pequenas séries de compostos congêneres através do uso de métodos de regressão relativamente simples, para a análise de conjuntos de dados muito grandes que compreendem milhares de estruturas moleculares diferentes, empregando uma ampla variedade de técnicas de aprendizado de máquina (CHERKASOV et al., 2014). O QSAR se apresenta hoje como uma técnica robusta, de enorme interesse da academia e indústria farmacêutica (CRAMER, 2012).

Estudos de QSAR apresentam várias aplicações, tais como: (i) identificação racional de novos ligantes/protótipos com atividade/propriedade desejada; (ii) otimização da atividade/propriedade; e a (iii) identificação de compostos com efeitos potencialmente perigosos em estágios preliminares do desenvolvimento (TROPISHA, 2010). Com efeito, o crescente desenvolvimento das “ômicas”, aliado ao aprimoramento de recursos computacionais, ao progressivo aumento da disponibilidade de conjuntos de dados de alta qualidade e ao desenvolvimento de modelos preditivos, levam a crer que o campo de estudos de modelagem de QSAR e suas aplicações tendem a aumentar (FOURCHES, 2014).

A abordagem de QSAR pode ser descrita como um método estatístico de análise de dados para desenvolver modelos que possam prever corretamente determinada atividade biológica ou propriedade de compostos baseados em sua estrutura química. Dois tipos de informações são necessárias para o desenvolvimento desses modelos: (i) a atividade biológica/propriedade e (ii) descritores químicos (Figura 2). Essa relação é gerada pela aplicação de métodos de regressão ou aprendizado de máquina (CRONIN, 2010; TROPSHA, 2010).

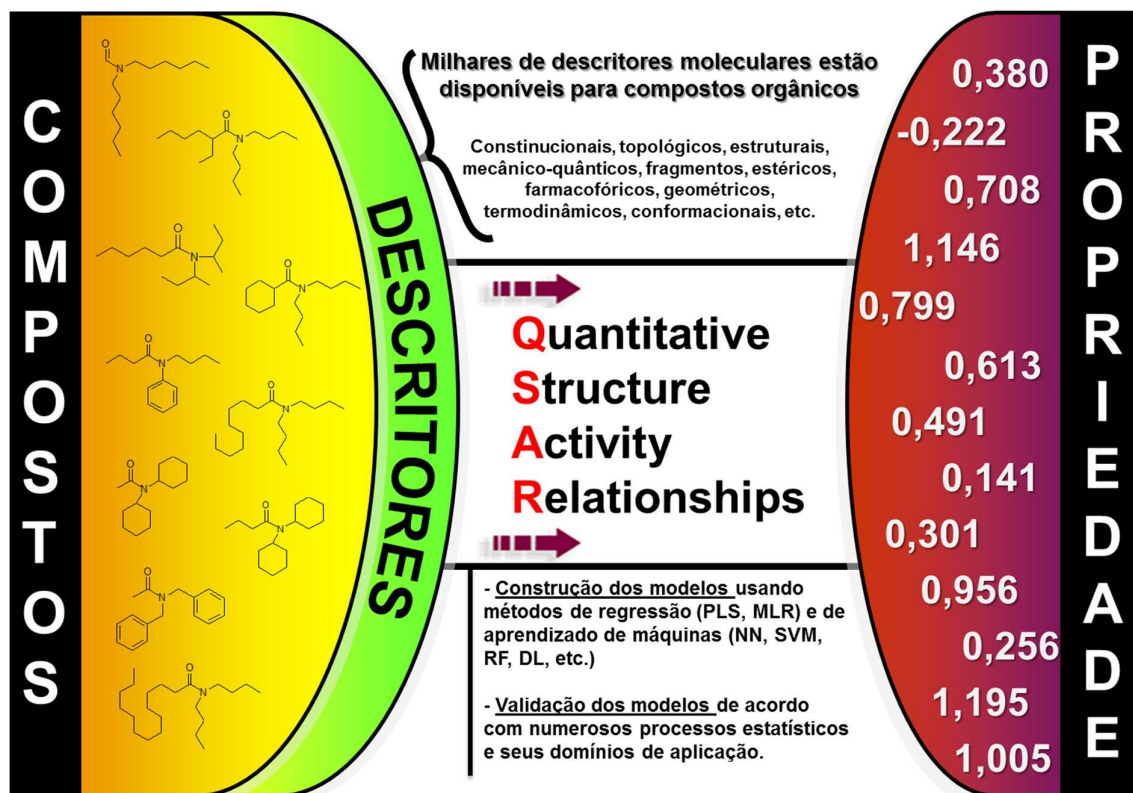


Figura 2. Esquema representando a geração de um modelo de QSAR (modificado de TROPSHA, 2010). PLS: *partial least squares*; MLR: *multiple linear regression*; NN: *neural networks*; SVM: *Support vector machine*; RF: *random forest*; DL: *deep learning*.

Atualmente, o desenvolvimento manual de um modelo matemático demoraria, possivelmente, uma vida inteira de trabalho, visto que existem milhares de descritores moleculares disponíveis (TODESCHINI; CONSONNI, 2009) e a quantidade de dados associados a estruturas químicas tem crescido rapidamente nos últimos anos (FOURCHES, 2014). Para lidar com essa imensa quantidade de informação, métodos computacionais tornam-se imprescindíveis. Métodos de aprendizado de máquina estabelecem peso aos descritores, ajustando a equação que relaciona a estrutura

química com a atividade biológica ou propriedade (Figura 2) (TROPSHA, 2010). Esses métodos têm sido amplamente empregados e são praticamente tão importantes quanto os dados de atividade biológica e descritores moleculares (MELVILLE; BURKE; HIRST, 2009).

O aprendizado de máquina é um ramo da inteligência artificial que diz respeito ao estudo e construção de sistemas que podem aprender com dados. Esse aprendizado é construído em três estágios: (i) representação dos dados; (ii) otimização da hipótese; (iii) generalização. Na geração de um modelo de QSAR, uma hipótese (equação) é gerada na tentativa de estabelecer uma relação dos descritores com a atividade biológica e, em seguida, essa relação é otimizada em um determinado número de vezes. A capacidade de generalização da hipótese é então testada em um conjunto de dados não utilizado para gerar ou otimizar a hipótese. Aqui, generalizar diz respeito à habilidade da hipótese em prever corretamente um exemplo/tarefa (no caso, propriedade da molécula) não usado na geração dos modelos (conjunto teste) (WELLING, 2011).

Especificamente para modelos de QSAR, descritores moleculares são calculados para um conjunto de compostos com propriedade biológica definida experimentalmente. Esses descritores são usados para treinar o algoritmo, o qual faz uma representação da atividade biológica ou propriedade com base nos descritores, seguido de uma otimização dessa representação e, por fim, uma generalização da propriedade predita com base na equação gerada (Figura 2). Os modelos gerados, uma vez validados, constituem um ponto de partida para seleção de novos compostos (TROPSHA, 2010; DOMINGOS, 2012).

Apesar do crescente uso e relevância estatística, os modelos de QSAR ainda são menos apreciados do que métodos qualitativos em toxicologia devido ao estigma de "caixa preta" (RAUNIO, 2011), o qual diz respeito à percepção de falta de interpretabilidade (Figura 1). Embora menos apreciado, modelos de QSAR podem, de fato, ser interpretados (POLISHCHUK et al., 2013). No entanto, a dificuldade de interpretar os modelos de QSAR, especialmente por não especialistas, levou as agências regulatórias americanas e europeias a preferir o uso de simples alertas estruturais para as predições de várias propriedades (RAUNIO, 2011). Por outro lado, a capacidade do QSAR em fornecer uma avaliação quantitativa confiável da potencial toxicidade de um produto químico é altamente vantajosa. Assim, existe uma forte necessidade de se desenvolver um método que combine o poder preditivo de modelos de QSAR mantendo ao mesmo tempo a transparência.

1.4 Sensibilização cutânea

A dermatite de contato alérgica é uma doença prevalente em países industrializados com alto impacto na capacidade de trabalho individual e qualidade de vida (MACAN et al., 2013). Essa doença é causada pela exposição tópica a compostos químicos alergênicos (HENNINO et al., 2005) e, devido à abundância desses compostos sendo comercializados, é imprescindível que compostos químicos perigosos devam ser identificados e substituídos por alternativas mais seguras (COLLINS, 2003; SCHULTE et al., 2013).

A via de efeito adverso da dermatite de contato alérgica é caracterizada por duas fases (Figura 3): a sensibilização cutânea e eliciação da resposta imune (HENNINO et al., 2005; OECD, 2012). Depois que um composto alergênico atinge a epiderme viável, a primeira fase é iniciada através da ligação química com proteínas/peptídeos da pele para formar um complexo imunogênico. A segunda fase é um processo inflamatório mediado por células T específicas (OECD, 2012; FYHRQUIST; LEHTO; LAUERMA, 2014).

A sensibilização cutânea é avaliada em seres humanos usando o teste de contato repetido (HRIPT, do inglês, *human repeat-insult patch test*) e suas variações (SCHWARTZ; PECK, 1946; KLIGMAN, 1966a; GRIFFITH, 1969; MARZULLI; MAIBACH, 1976; POLITANO; API, 2008). O teste de contato maximizado (HMT, do inglês, *human maximization test*) (KLIGMAN, 1966b; KLIGMAN; EPSTEIN, 1975) foi projetado para ser um ensaio sensível, onde o passo de "maximização" leva a uma ligeira irritação da pele. Na maioria dos países, esses métodos enfrentam tanto problemas éticos quanto de validade científica, só sendo usados para confirmar doses seguras (KIMBER et al., 2001; BASKETTER, 2009).

Em paralelo, os testes em animais comuns para a sensibilização cutânea incluem o GMPT (do inglês, *guinea pig maximization test*) (MAGNUSSON; KLIGMAN, 1969), diretriz 406 da OECD (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*) (OECD, 1992), e o ensaio de LLNA (do inglês, *local lymph node assay*) (BASKETTER et al., 2002); sendo o último considerado como o modelo animal preferencial para se avaliar a sensibilização da pele por várias agências reguladoras, como a Executiva de Segurança e Saúde Do Reino Unido (COCKSHOTT et al., 2006) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2003).

Neste ensaio, a substância-teste é administrada topicamente na orelha de camundongos. A sensibilização cutânea é quantificada por meio da proliferação de

linfócitos (índice de estímulo), a qual está correlacionada com a extensão da sensibilização após uma exposição repetida a uma substância sensibilizante. A primeira diretriz da OECD sobre o LLNA, diretriz 429 (OECD, 2010a), delimitava o limiar para uma dose positiva como um índice de estímulo ≥ 3 . A concentração necessária para produzir um índice de estímulo ≥ 3 é denominada de EC3 (BASKETTER et al., 2002). Duas modificações do LLNA que usam métodos não radioativos já foram descritas por diretrizes da OECD. Nessas diretrizes, 442a (OECD, 2010b) e 442b (OECD, 2010c), o limiar de positividade é 1,8 e 1,6, respectivamente. Uma outra variação deste ensaio, chamado de rLLNA (do inglês, *reduced local lymph node assay*), é capaz reduzir o número de animais utilizados para testes em quase 40% (ICCVAM, 2009; ROBERTS, 2015).

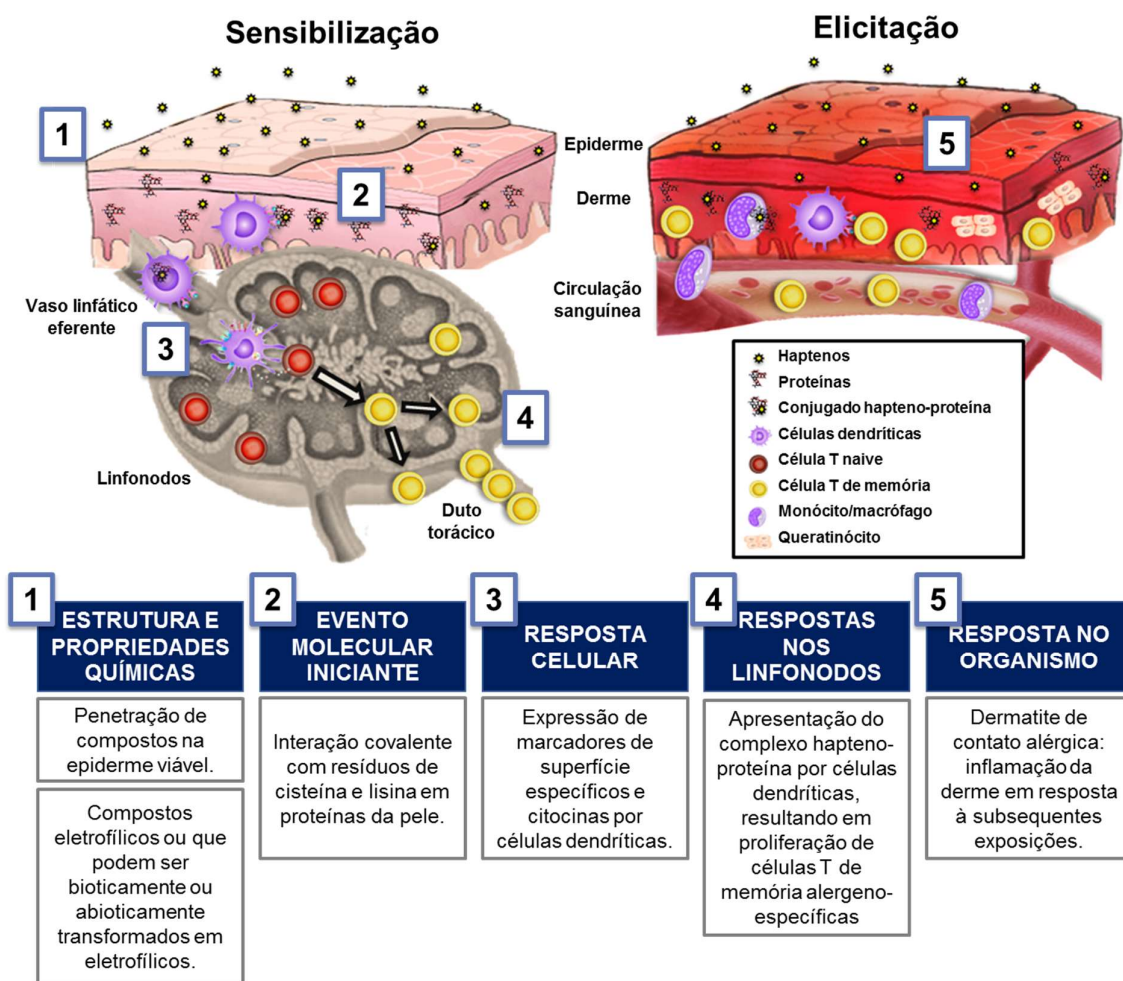


Figura 3. Via de efeito adverso da sensibilização da pele, modificado de Karlberg et al. (2008) e OECD (2012).

Inicialmente, o LLNA mostrou boa correlação geral com a resposta em seres humanos (BASKETTER et al., 2000; RYAN et al., 2000; GERBERICK et al., 2001;

GRIEM; GOEBEL; SCHEFFLER, 2003; SCHNEIDER; AKKAN, 2004). No entanto, alguns estudos recentes relataram diversos casos que a dose-resposta no LLNA não descreve bem o comportamento das mesmas estruturas em seres humanos (ICCVAM, 2011; API; BASKETTER; LALKO, 2014).

Vários testes *in vitro* têm sido propostos para abordar pontos-chave da via de efeito adverso da sensibilização cutânea. A título de exemplo, cita-se o DPRA (do inglês, *direct peptide reactivity assay*) (GERBERICK et al., 2004), KeratinoSens™ e U-SENS™ (PIROIRD et al., 2015) e o h-CLAT (do inglês, *human cell-line activation test*) (ASHIKAGA et al., 2006). O DPRA (EURL ECVAM, 2013; OECD, 2015a) e o KeratinoSens™ (EURL ECVAM, 2014; OECD, 2015b) já estão validados para avaliação da sensibilização cutânea pela ECVAM (do inglês, *European Centre for the Validation of Alternative Methods*) quando usados em estratégias integradas de ensaio.

Uma análise recente revelou que ensaios *in chemico* e *in vitro* identificaram corretamente a maioria dos compostos que necessitam de ativação para serem sensibilizadores, apesar de certa divergência entre os ensaios (CASATI et al., 2016). Isso reforça a importância da aplicação de estratégias de ensaio integradas para abordar várias etapas-chave da via de efeito adverso da sensibilização cutânea (MACKAY et al., 2013; STRICKLAND et al., 2016).

Vários estudos têm apresentado modelos computacionais para prever a sensibilização da pele com base no LLNA (ESTRADA et al., 2003; FEDOROWICZ et al., 2004, 2005; LI et al., 2007; MILLER et al., 2005; LI et al., 2005; ROBERTS; APTULA; PATLEWICZ, 2006; ROBERTS et al., 2007a; GOLLA et al., 2009; YUAN; HUANG; CAO, 2009; CHAUDHRY et al., 2010; GUNTURI et al., 2010; LU et al., 2011; NANDY; KAR; ROY, 2013a, 2013b, 2014; DEARDEN et al., 2015; KOSTAL; VOUTCHKOVA-KOSTAL, 2016; ASTURIOL; CASATI; WORTH, 2016). Como já mencionado em nossas recentes publicações (ALVES et al., 2015a, 2015b), a maioria dos modelos de QSAR propostos para sensibilização cutânea não são compatíveis com as boas práticas de desenvolvimento de modelos e validação (TROP SHA, 2010; CHERKASOV et al., 2014), e assim a sua confiabilidade não é garantida.

Na tentativa de considerar a via de efeito adverso da sensibilização cutânea, alguns grupos têm gerado modelos de QSAR locais usando informações mecanísticas (ROBERTS; APTULA; PATLEWICZ, 2006; DEARDEN et al., 2015). O mecanismo biológico de sensibilização cutânea é muito bem definido e há várias subestruturas químicas associadas a este mecanismo de ação (adição de Michael, bases de Schiff,

transferência de acila) (CASATI et al., 2016). No entanto, estes modelos foram gerados usando pequenos conjuntos de dados devido ao pequeno tamanho de informações acessíveis ao público e ao elevado número de compostos sem alertas estruturais para a sensibilização cutânea. Por exemplo, autores desenvolveram modelos de QSAR baseados em regressão para sensibilização da pele (NANDY; KAR; ROY, 2013b), no entanto, tais modelos foram gerados usando um pequeno conjunto de dados de 51 compostos, o que resultou em um domínio de aplicabilidade limitado.

Um estudo recente relatou modelos híbridos que usaram alertas estruturais juntamente com descritores químicos (ASTURIOL; CASATI; WORTH, 2016). A precisão do modelo foi de 93%, com sensibilidade de 98% e especificidade de 85% para 269 compostos químicos. Outro estudo propôs um modelo hierárquico, onde a permeabilidade da pele é avaliada através de simulações de Monte Carlo; a reatividade química é determinada por regras elaboradas por especialistas (do inglês, *expert rules*) e a reatividade proteica é predita por meio de modelagem de mecânica quântica (KOSTAL; VOUTCHKOVA-KOSTAL, 2016). Os autores relataram resultados visivelmente impressionantes para a predição de sensibilização cutânea de um conjunto externo, na sua maioria composta por dados de LLNA e porquinhos da Índia: sensibilidade de 87%, especificidade de 100% e taxa de classificação correta (TCC) de 93%, o que supera a concordância de 89% entre LLNA e porquinhos da Índia, levantando suspeitas sobre a qualidade do estudo (ANDERSON; SIEGEL; MEADE, 2011).

Métodos computacionais representam uma abordagem atraente para a concepção de compostos químicos mais seguros (MAERTENS et al., 2014; NAVEN; LOUISE-MAY, 2015; GRAMATICA; CASSANI; SANGION, 2016; MELNIKOV et al., 2016). Além de alta precisão, também é fundamental que os modelos computacionais sejam capazes de prever efeitos biológicos dos compostos químicos que são mais relevantes para a saúde humana. Até o momento, não houve relatos sobre a modelagem computacional de dados de sensibilidade da pele humana, que tem o potencial de aumentar a precisão da avaliação química em estágios iniciais, especialmente quando usado em combinação com outras estratégias (PATLEWICZ et al., 2014; STRICKLAND et al., 2016).

Ao mesmo tempo, a comunidade científica carece de programas de computador e/ou servidores *web* capazes de prever a sensibilização cutânea com alta precisão. A grande maioria dos softwares disponíveis, como QSAR Toolbox

(OECD, 2014), ToxAlerts (<https://ochem.eu/>) (SUSHKO et al., 2012) e Toxtree (toxtree.sourceforge.net/) se baseiam em alertas estruturais. Outros programas, como VEGA QSAR (VEGA, 2014), possuem preditividade comprometida por não seguirem as boas práticas de desenvolvimento e validação de modelos de QSAR (ALVES et al., 2015a). Dessa forma, nota-se que modelos de QSAR robustos e preditivos baseados em dados de pele humana representam um enorme avanço científico. Além disso, o desenvolvimento tecnológico de um aplicativo para *web* que incorpore esses modelos e que seja de fácil uso pode ser útil tanto para toxicologistas quanto para agências regulatórias. Por fim, reforça-se a necessidade de mudar o paradigma do uso de alertas estruturais em toxicologia.

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e aplicar novos métodos de quimioinformática para prever a sensibilização cutânea humana e animal de compostos químicos que carecem de dados experimentais.

2.2 Objetivos específicos

Considerando a necessidade de se desenvolver compostos mais seguros e menos propensos a induzir a sensibilização da pele, e a dificuldade na obtenção de dados humanos, os objetivos específicos foram:

- i. Analisar a concordância entre os resultados dos testes em humanos (HRIPT e HMT) e o modelo animal (LLNA);
- ii. Desenvolver e validar modelos de QSAR robustos e preditivos para a sensibilização da pele baseados em dados de pele humana e animal;
- iii. Avaliar o desempenho dos modelos de QSAR e LLNA na predição de sensibilização da pele humana;
- iv. Analisar o desempenho dos modelos de QSAR e LLNA em grupos de compostos estruturalmente semelhantes para identificar qual abordagem é mais eficiente para grupos de compostos;
- v. Desenvolver um aplicativo para a *web* e dispositivos móveis capaz de prever a sensibilização de pele humana e murina;
- vi. Comparar os modelos de QSAR desenvolvidos com estratégias baseadas em alertas estruturais;
- vii. Propor um novo método que integre modelos de QSAR e alertas estruturais para avaliação de propriedades toxicológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta tese está dividida em três partes. Para facilitar a compreensão, sugere-se que Resultados e Discussões da parte I sejam lidos logo após Materiais e Métodos dessa parte e assim por diante.

Esse trabalho foi realizado em estações computacionais no Laboratório de Planejamento de Fármacos e Modelagem Molecular (LabMol) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás e no *Laboratory for Molecular Modeling* da *UNC Eshelman School of Pharmacy* da *University of North Carolina at Chapel Hill* (UNC). Os trabalhos foram desenvolvidos em computadores com processadores Quad-Core AMD Phenom II e 12-16 GB de memória RAM.

As seguintes bases de dados, *softwares*, linguagens de programação e *scripts*, pacotes e servidores/ferramentas baseadas em *web* foram utilizados:

- Bases de dados: Chemicalize (<http://www.chemicalize.org/>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>), CosIng (<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>), SciFinder (scifinder.cas.org/scifinder/), e ToxCast (<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecasting>);
- *Softwares*: CBRA (<https://www.fourches-laboratory.com/software>) (LOW et al., 2013), DRAGON v. 5.5 (<http://www.taletе.mi.it/>) (TALETE SRL, 2007), GUSAR (<http://www.way2drug.com/gusar/>) (FILIMONOV et al., 2009), HiT QSAR (KUZ'MIN; ARTEMENKO; MURATOV, 2008), ISIDA/Cluster (<http://infochim.u-strasbg.fr>), JSME (BIENFAIT; ERTL, 2013), KNIME (<https://www.knime.org/>) (MAZANETZ et al., 2012);
- *Scripts* e linguagens de programação: Python (<https://www.python.org>), scikit-learn (<http://scikit-learn.org>), JavaScript (<http://www.ecma-international.org>);
- Pacotes: QSAR Toolbox (<https://www.qsartoolbox.org/>) (OECD, 2016), RDKit (<http://www.rdkit.org>), Standardizer (v. 15.10.12.0, ChemAxon, Budapeste, Hungria, <http://www.chemaxon.com/>);
- Servidores/ferramentas baseadas em *web*: ChemoText (<http://chemotext.mml.unc.edu/>) (BAKER; HEMMINGER, 2010), Flask (<http://flask.pocoo.org>), Nginx (<http://nginx.org>), ToxAlerts

(<https://ochem.eu/>) (SUSHKO et al., 2012), uWSGI (<https://uwsgi-docs.readthedocs.org>).

Uma máquina virtual foi instalada no Ubuntu usando o *software* VirtualBox (<https://www.virtualbox.org/>) com sistema operacional Windows XP para rodar o HiT QSAR.

3.1 Parte I: sensibilização cutânea humana

O fluxo de trabalho geral apresentado nesta sessão está resumido na Figura 4. Primeiramente, os conjuntos de dados originais de sensibilização cutânea humana e murina (LLNA) foram compilados e preparados independentemente. Em seguida, foi realizada uma análise de concordância entre os dados de sensibilização humana e os dados de LLNA. A partir do conjunto de dados de pele humana já preparado, foram calculados descritores moleculares. Foram gerados modelos com a variável Y aleatorizada para garantir que a preditividade dos modelos de QSAR não ocorreu por acaso. A análise de agrupamentos hierárquicos foi realizada para se avaliar a diversidade estrutural do conjunto de dados e observar o comportamento biológico em grupos de estruturas semelhantes. Modelos de QSAR robustos e preditivos foram gerados usando o método de validação cruzada externa *5-fold*. Foi feita uma otimização estrutural de compostos químicos para exemplificar como os modelos desenvolvidos nesse trabalho podem ser usados por outros pesquisadores para propor novas moléculas potencialmente mais seguras. Por fim, foi feito a triagem virtual de uma base de dados de cosméticos e ingredientes denominada CosIng, para que a comunidade científica pudesse se beneficiar dessas avaliações. Os detalhes dessas etapas são descritos a seguir.

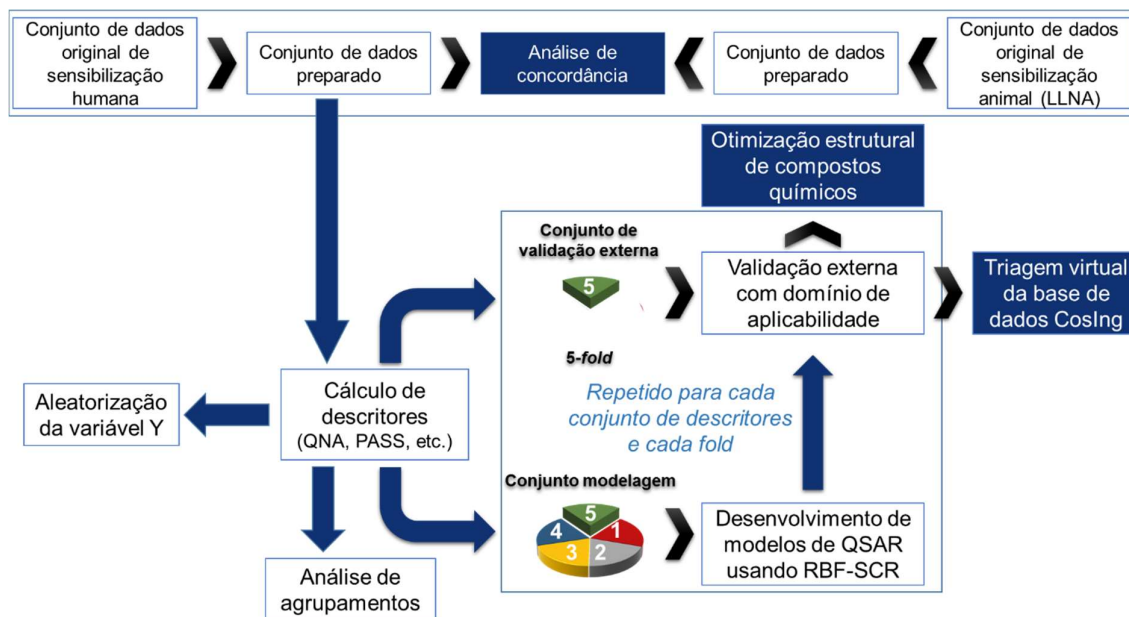


Figura 4. Fluxo de trabalho para desenvolvimento dos modelos de QSAR (modificado de Tropsha (2010). QNA: *Quantitative Neighborhoods of Atoms*; PASS: *Prediction of Activity Spectra of Substances*).

3.1.1 Conjuntos de dados

3.1.1.1 Sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A)

O conjunto de dados utilizado neste estudo foi recuperado do relatório do ICCVAM sobre uso e limitações do LLNA para prever a sensibilização cutânea em seres humanos (ICCVAM, 2011). Esse conjunto de dados foi reavaliado e ampliado por pesquisadores do *Integrated Laboratory Systems* (<http://www.ils-inc.com/>). O conjunto de dados completo e corrigido está disponível nos Anexos (Tabela A1). Por exemplo, os testes para (cloro)metilisotiazolinona foram, de fato, realizados em mistura com metilisotiazolinona, ou seja, para Kathon (nome comercial da mistura); por conseguinte, estas entradas foram alteradas para Kathon. Além disso, alguns testes foram previamente combinados (usaram a mesma concentração, mas veículos diferentes) e agora foram separados. O conjunto de dados inicialmente consistia em 302 registros químicos (cada registro refere-se a um composto químico, mas devido a presença de duplicatas, vários registros podem descrever o mesmo composto) e dados de pele humana associados. O potencial de sensibilização da pele foi baseado em dados humanos de DSA₀₅ (dose por área de pele que produz uma resposta positiva em 5% da população testada), uma vez que tem sido demonstrado que

corresponde melhor com o valor de dose-resposta do LLNA do que outras propriedades, como nível de efeito adverso não observado (NOEL, do inglês, *no observed effect level*) ou nível mínimo com efeitos observados (LOEL, do inglês, *lowest observed effect level*) (ICCVAM, 2011).

Depois do preparo, 135 substâncias únicas foram mantidas para este estudo. Essa lista continha 26 substâncias inorgânicas ou misturas que foram usadas para comparação com o LLNA (Tabela A1) mas que não foram incluídas no conjunto modelagem porque descritores químicos não puderam ser computados para elas. Dada a complexidade da sensibilização cutânea e a falta de dados adicionais, decidiu-se designar compostos com ambos os resultados positivos e negativos como sensibilizadores devido ao peso da evidência dos dados, já que a maioria dos conflitos estavam relacionados com o veículo e/ou dose usados no teste. O conjunto de modelagem continha os 109 compostos restantes (63 sensibilizadores e 46 não-sensibilizadores) com estrutura química definida.

3.1.1.2 *Sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados B)*

Foram obtidos dados de LLNA a partir de um relatório mais recente do ICCVAM (ICCVAM, 2013). Esses ensaios seguiram a diretriz 429 da OECD (OECD, 2010a). Essa fonte continha informações de 1.060 testes de LLNA. Depois do preparo, todos os dados LLNA para as 135 substâncias únicas presentes no conjunto de dados humana (Conjunto de Dados A) foram compilados (ver Tabela A1). Somente as 109 substâncias com estruturas químicas definidas foram utilizadas para a comparação entre os modelos de QSAR e LLNA na predição de dados de humanos.

3.1.1.3 *Base dados da CosIng (Conjunto de Dados C)*

CosIng é a base de dados da Comissão Europeia que inclui informações sobre produtos cosméticos e ingredientes (<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>). Foram obtidos 5.166 registros, e depois do preparo, 3.964 compostos químicos únicos foram utilizados para triagem virtual. A análise inicial do banco de dados da *CosIng* revelou 76 compostos químicos já presentes no conjunto de dados de pele humana (Conjunto de Dados A), incluindo 38 sensibilizadores e 38 não-sensibilizadores. Assim, aplicou-se os modelos de QSAR desenvolvidos para prever o potencial de sensibilização da pele humana para os 3.888 compostos restantes, que não possuíam dados biológicos públicos de sensibilização em seres humanos.

3.1.2 Preparo químico e biológico dos dados

Informações das estruturas de compostos químicos foram retiradas das bases de dados da Chemicalize (<http://www.chemicalize.org/>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) e SciFinder (scifinder.cas.org/scifinder/) usando-se o número de registro do *Chemical Abstracts Services* (CAS) ou nomes químicos. Compostos sem estrutura química definida/depositada em uma dessas bases de dados foram removidos. Cada conjunto de dados foi independentemente preparado (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010, 2015, 2016). Contraíons foram removidos e quimiotipos específicos como grupos aromáticos e nitro foram normalizados usando o software Standardizer (v. 15.10.12.0, ChemAxon, Budapeste, Hungria, <http://www.chemaxon.com/>). Sais inorgânicos, compostos organometálicos, polímeros e misturas também foram removidos. A presença de duplicatas, ou seja, compostos idênticos reportados mais de uma vez no mesmo conjunto de dados, é conhecida por levar a uma superestimação da preditividade dos modelos de QSAR gerados. Contudo, a análise de tais registros também permite estimar a qualidade do conjunto de dados: se os dados de atividade para o mesmo composto são semelhantes, a qualidade dos dados é alta; se existe um grande desvio dos valores experimentais, a qualidade é baixa. As duplicatas foram identificadas usando o *software* HiT QSAR (KUZ'MIN; ARTEMENKO; MURATOV, 2008) e cuidadosamente analisadas.

3.1.3 Análise da concordância de dados de pele humana vs. dados de LLNA

A análise de concordância de dados de pele humana vs. dados de LLNA foi realizada para verificar a relevância do LLNA em prever resultados humanos. Os compostos que foram testados em ambos os ensaios foram analisados em três formas diferentes: binário (sensibilizador vs. não-sensibilizador; 109 compostos); multiclasse (sensibilizador extremo/forte, sensibilizador moderado/fraco, e não-sensibilizador; 109 compostos); e escala contínua (concentração em mol/m²; 52 compostos). Todos os compostos foram divididos em várias classes de acordo com a sua potência em ensaios diferentes. No LLNA a potência é avaliada pelo EC₃, que é a dose que produz o índice de estimulação de três, o limiar para uma resposta positiva no LLNA (ver item 1.4). Ao usar dados de EC₃ do LLNA, foram definidas três classes: sensibilizador extremo/forte tinha EC₃ menor ou igual a 2%; sensibilizador moderado/fraco tinha EC₃ entre 2% e 100%; e compostos sem valores de EC₃ foram definidos como não-sensibilizadores. Para os dados humanos, sensibilizadores extremos/fortes foram

definidos como proposto pelo GHS (do inglês, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) (UNITED NATIONS, 2015): compostos com DSA_{05} (ver item 1.4) menor ou igual a 500 mol/m^2 ; fracos/moderados sensibilizadores teve valores de DSA_{05} acima de 500 mol/m^2 ; e compostos sem valores de DSA_{05} foram definidos como não-sensibilizadores. Em seguida, comparou-se os dados de potência quantitativos para resultados de ensaios humanos e LLNA para detectar o nível de concordância. Para essa análise, foram excluídos onze sensibilizadores humanos, ou porque não foi possível calcular a concentração molar (misturas), ou porque composto era um não sensibilizante no LLNA.

3.1.4 Abordagens de quimioinformática

3.1.4.1 Análise de agrupamento hierárquico

A análise de agrupamento hierárquico é um método de aprendizado não supervisionado. Neste estudo empregou-se o método *Sequential Agglomerative Hierarchical Non-overlapping* implementado no *software* ISIDA/Cluster (<http://infochim.u-strasbg.fr>) (VARNEK et al., 2007). No método em questão, cada composto representa um grupo no início. Então, os n compostos são agrupados iterativamente em grupos usando suas distâncias euclidianas armazenadas em uma matriz quadrada de distâncias simétricas ($n * n$). Os dois objetos mais próximos (compostos ou grupos) são iterativamente identificados e agrupados para formar um novo grupo. A matriz de distâncias é atualizada com as novas distâncias separando o novo grupo dos outros, de acordo com o tipo de acoplamento selecionado pelo usuário (nesse estudo foi usado o acoplamento completo). O processo se repete até que reste apenas um grupo. A relação sequencial de formação dos grupos resulta em um gráfico hierárquico chamado de dendrograma. Esse *software* gera um dendrograma e um mapa de calor da matriz de distância colorida de acordo com a similaridade/dissimilaridade entre os compostos. Tal método foi aplicado para verificar a diversidade estrutural dos compostos no conjunto de dados e identificar possíveis relações estrutura-atividade no sucesso/insucesso de prever a sensibilização da pele humana por modelos de QSAR e LLNA.

3.1.4.2 Descritores moleculares

Neste trabalho, os seguintes descritores moleculares foram calculados usando o *software* GUSAR (<http://www.way2drug.com/gusar/>): QNA (do inglês, *quantitative*

neighborhoods of atoms) (FILIMONOV et al., 2009), descritores globais e descritores "biológicos" (LAGUNIN et al., 2011), que representam várias predições de bioatividade calculadas pelo algoritmo do PASS (do inglês, *Prediction of Activity Spectra of Substances*) (LAGUNIN et al., 2009).

Descritores QNA são calculados por funções definidas pelo potencial de ionização, afinidade de elétrons para cada átomo e a matriz de conectividade para a molécula (ZAKHAROV et al., 2016). Os descritores globais utilizados no GUSAR calculam comprimento e volume topológicos, lipofilicidade, número de cargas positivas, o número de cargas negativas, número de aceptores de ligações de hidrogênio, o número de doadores de ligações de hidrogênio, o número de átomos de aromáticos, peso molecular, e o número de átomos de halogênio (LAGUNIN et al., 2011; ZAKHAROV et al., 2012).

Os descritores "biológicos" são calculados usando o algoritmo PASS (LAGUNIN et al., 2011), que prediz uma ampla gama de resultados biológicos incluindo a ligação à proteína transportadora, atividades de expressão gênica, e vários mecanismos de ação, totalizando aproximadamente 6.400 "atividades biológicas" com uma acurácia média de pelo menos 95%. É computado a probabilidade de que o composto seja ativo (P_a) e a probabilidade de que ele seja inativo (P_i). A diferença entre esses dois valores ($P_a - P_i$) para um subconjunto selecionado aleatoriamente das atividades preditas constitui um descritor molecular.

3.1.4.3 Algoritmo RBF-SCR

No algoritmo RBF SCR, os descritores são ponderados durante o cálculo das funções de base radial (RBF, do inglês, *radial basis function*) pelos coeficientes de regressão obtidos a partir de regressão autoconsistente (SCR, *self consistent regression*). Esses coeficientes refletem a contribuição de cada descritor particular (variável) para a equação final da atividade específica. Quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, maior é a sua contribuição. Esse algoritmo usa funções de base radial lineares, as quais permitem a modelagem de diversos conjuntos de treinamento com um alto nível de dissimilaridade entre os objetos do conjunto de dados. Assim, as características relevantes desse método são: (i) os pesos para cada vetor de descritor usado para o cálculo da RBF são baseados na importância do descritor para a atividade específica determinado por SCR, e (ii) funções de base linear são usados para uma melhor descrição de conjuntos de dados diversos (ZAKHAROV et al., 2014).

3.1.4.4 Geração dos modelos de QSAR

Modelos de QSAR binários foram desenvolvidos e rigorosamente validados de acordo com as melhores práticas de modelagem de QSAR (TROP SHA, 2010). Os modelos de QSAR foram desenvolvidos com o algoritmo RBF-SCR (ver seção anterior) implementado no software GUSAR (FILIMONOV et al., 2009).

Neste trabalho foi empregado o método de validação cruzada externa de *5-fold* (Figura 4): o conjunto de dados total com atividade experimental definida foi dividido pelo algoritmo de Kennard-Stone (KENNARD; STONE, 1969) em cinco subgrupos de tamanhos iguais. Então, um desses subgrupos (20% de todos os compostos) foi definido como conjunto de validação externa e os quatro conjuntos restantes formam o conjunto modelagem (80% de todo o conjunto de dados). Esse procedimento foi repetido cinco vezes permitindo que cada um dos cinco subconjuntos seja usado como conjunto de validação externa. Os modelos foram gerados usando apenas o conjunto modelagem. É importante enfatizar que o conjunto de validação externa nunca foi empregado para geração e/ou seleção dos modelos. Cada conjunto modelagem é dividido em vários conjuntos de treinamento e teste; então os modelos são gerados usando compostos de cada conjunto treinamento e aplicados aos conjuntos testes para avaliar a preditividade.

Os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliar diferentes aspectos da preditividade dos modelos binários de sensibilização cutânea (Equações 1-5):

Taxa de classificação correta (TCC):

$$TCC = \frac{(\text{sensibilidade} + \text{especificidade})}{2} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad \text{Equação 3}$$

Valor de preditividade positiva (VPP):

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \quad \text{Equação 4}$$

Valor de preditividade negativa (VPN):

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} \quad \text{Equação 5}$$

em que VP é o número de verdadeiros positivos, VN é o número de verdadeiros negativos, FP é o número de falsos positivos e FN é o número de falsos negativos.

Os melhores modelos foram identificados e selecionados de acordo com valores aceitáveis de TCC ($TCC \geq 0,6$) (TROP SHA, 2010) para os múltiplos conjuntos testes e que passassem pelo teste de aleatorização da variável **Y**. Nesse procedimento, a variável **Y** (atividade biológica) é aleatorizada e modelos são gerados. Caso a preditividade dos modelos com variável **Y** aleatória obtenha resultados melhores que os modelos de QSAR, os modelos devem ser descartados, uma vez que os descritores moleculares não descrevem bem **Y** (KUZ'MIN et al., 2009).

O domínio de aplicabilidade ou domínio de aplicação (DA) é uma característica importante de qualquer modelo de QSAR (GADALETA et al., 2016; MATHEA; KLINGSPORN; BAUMANN, 2016). Neste trabalho, o DA foi estimado usando-se três diferentes abordagens: semelhança, influência e avaliação de precisão. Uma vez que no GUSAR vários modelos internos são desenvolvidos para cada *fold*, um composto é considerado como estando dentro do DA, se for encontrado no interior de, pelo menos, um modelo (ZAKHAROV et al., 2014). Como a preditividade dos modelos desenvolvidos foi validada, eles foram aplicados para prever o potencial de sensibilização cutânea dos ingredientes usados em cosméticos obtidos a partir do banco de dados da CosIng (<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>). Os modelos de QSAR desenvolvidos estão disponíveis para uso da comunidade científica no material suplementar do artigo "QSAR models of human data can enrich or replace LLNA testing for human skin sensitization" (ALVES et al., 2016a).

3.1.4.5 Mineração de texto

Uma ferramenta de mineração de texto denominada ChemoText (<http://chemotext.mml.unc.edu/>) (BAKER; HEMMINGER, 2010) foi usada para validar

o potencial de sensibilização cutânea de "hits" identificados pelos modelos de QSAR. O ChemoText é um banco de dados gráfico que é usado para extrair termos MeSH (do inglês, *Medical Subject Headings*) e do identificador dos artigos indexados no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). A versão atual contém mais de 25 milhões de artigos científicos. O ChemoText, implementado como um servidor *web* (<http://chemotext.mml.unc.edu/>), analisa o PubMed para extrair termos MeSH que definem doenças, proteínas e compostos químicos. Essa ferramenta pode ser usada para encontrar casos em resumos de artigos indexados no PubMed onde certos termos MeSH ocorrem concomitantemente, ou seja, são mencionados juntos no resumo. Termos associados com sensibilização cutânea, como "*Occupational, Dermatitis*", "*Contact, Dermatitis*" e "*Allergic, Dermatitis*" foram consultados no ChemoText se ocorriam concomitantemente com os compostos selecionados pelos modelos como sensibilizadores. Se um "hit" e um termo MeSH de sensibilização cutânea foram encontrados concomitantemente no resumo de um artigo, o número de identificação do artigo no PubMed (PubMed ID) é informado. O potencial de sensibilização cutânea do "hit" foi verificado manualmente por inspeção do artigo correspondente.

3.2 Parte II: desenvolvimento de um aplicativo para *web* capaz de avaliar a sensibilização cutânea de compostos químicos

3.2.1 Conjuntos de dados

Os conjuntos de dados usados nessa parte foram preparados conforme descritos no item 3.1.2.

3.2.1.1 Sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A)

O Conjunto de Dados A, conforme descrito na Parte I deste trabalho, foi utilizado também nesta parte.

3.2.1.2 Sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados D)

Utilizou-se a mesma fonte de dados descrita no Conjunto de Dados B (ICCVAM, 2013). Contudo, na Parte I, apenas as 135 estruturas presentes no Conjunto de Dados A foram mantidas para análise. Nessa parte, todas as estruturas únicas e com estrutura química definida foram mantidas após o preparo dos dados iniciais. Essa fonte continha informações de 1.060 testes de LLNA. Depois do preparo,

515 compostos foram mantidos, sendo 331 sensibilizadores e 184 não-sensibilizadores. Por motivos didáticos, esse conjunto de dados será chamado de Conjunto de Dados D. Esse conjunto de dados foi utilizado independentemente de duas maneiras: (i) para geração de modelos binários (sensibilizador vs. não-sensibilizador) e (ii) para geração de modelos multiclassificatórios (não-sensibilizador vs. sensibilizador fraco/moderado vs. sensibilizador forte/moderado).

Para o desenvolvimento de modelos binários, esse conjunto de dados foi balanceado por subamostragem do grupo sensibilizador. Nesse caso, a intenção era aproximar a quantidade de compostos sensibilizadores e não-sensibilizadores ($n \approx 184$). Usou-se o grupo menor, contendo 184 não-sensibilizadores, como sonda para buscar e ordenar os sensibilizadores por similaridade. A seleção foi executada no módulo *Methods of Data Analysis* do software HiT QSAR (KUZ'MIN; ARTEMENKO; MURATOV, 2008). Primeiro, selecionou-se metade aproximada dos sensibilizadores (93 compostos) com menor distância Euclidiana ao não-sensibilizador mais próximo (para aumentar a capacidade do modelo em discriminar compostos semelhantes de classes diferentes); em seguida, selecionou-se a outra metade aproximada (92 compostos) aleatoriamente, considerando-se toda distribuição das distâncias dos sensibilizadores restantes (para aumentar o DA do modelo). Em outras palavras, esse procedimento garante que os modelos gerados sejam treinados para distinguir os casos mais difíceis (substâncias semelhantes), mas aumenta consideravelmente o DA do modelo, visto que a outra metade do conjunto treinamento é ocupada com substâncias estruturalmente diversas.

O conjunto de dados multiclassificatório consistiu em um conjunto maior, contendo 184 não-sensibilizadores, 235 sensibilizadores fracos/moderados e 71 sensibilizadores fortes/extremos, num total de 490 compostos. Vinte e cinco sensibilizadores presentes no conjunto de dados não foram utilizados para modelos multiclassificatórios devido à ausência dos dados de potência.

3.2.2 Abordagens de quimioinformática

3.2.2.1 Descritores moleculares

Descritores químicos de código aberto baseados em ECFP (do inglês, *extended-connectivity fingerprints*) com 2048 *bits* e raio atômico 2 foram calculados usando o módulo do RDKit (<http://www.rdkit.org>) disponível para a plataforma KNIME (<https://www.knime.org/>) (MAZANETZ et al., 2012). Esses descritores são fragmentos

topológicos circulares baseados no algoritmo Morgan. Inicialmente, um identificador numérico é atribuído para cada átomo. Em um segundo estágio, cada iteração tem o efeito de criar um identificador que representa subestruturas circulares em torno do átomo central cada vez maiores. Ao final, identificadores duplicados são removidos e as informações armazenadas em *bits*. O tamanho dessas subestruturas e o número de descritores são determinados pelo tamanho do raio selecionado e comprimento dos *bits* determinados pelo usuário. (ROGERS; HAHN, 2010).

3.2.2.2 Geração dos modelos de QSAR

Modelos de QSAR classificatórios e multiclassificatórios foram desenvolvidos usando-se protocolo de validação semelhante ao descrito na Parte I (ver item 3.1.4.4). Aqui, os modelos foram desenvolvidos usando *Random Forest* como método de aprendizado de máquina implementado em linguagem de *script* Python 2.7. Os modelos binários foram avaliados conforme as Equações 1-5, descritas no item 3.1.4.4. Os modelos multiclassificatórios foram avaliados conforme as equações as Equações 6-8 (ÖZGÜR; ÖZGÜR; GÜNGÖR, 2005).

$$Acurácia = \frac{\sum_{i=1}^M (VP_i + FN_i)}{\sum_{i=1}^M (VP_i + VN_i + FP_i + FN_i)} \quad \text{Equação 6}$$

$$Precisão = \frac{\sum_{i=1}^M VP_i}{\sum_{i=1}^M (VP_i + FP_i)} \quad \text{Equação 7}$$

$$Recall = \frac{\sum_{i=1}^M VP_i}{\sum_{i=1}^M (VP_i + FN_i)} \quad \text{Equação 8}$$

em que M é o número de categorias. No caso, M = 3 (sensibilizador forte/extremo, sensibilizador fraco/moderado, não-sensibilizador).

3.2.2.3 *Random Forest*

O *Random Forest* é um algoritmo composto por um conjunto de árvores de decisões (BREIMAN, 2001). O resultado de todas as árvores é agregado para obter uma predição final. Cada árvore cresce da seguinte maneira: (i) uma amostra

contendo n compostos é extraída por *bootstrap* do conjunto modelagem, formando o conjunto treinamento para a árvore em questão. Os compostos que não estão no conjunto treinamento compõem o conjunto *out-of-bag* (OOB), com tamanho de aproximadamente $n/3$; (ii) a melhor divisão dos descritores pelo algoritmo de classificação e regressão de árvores (CART) (BREIMAN et al., 1984) a partir dos m descritores selecionados de todo o conjunto de descritores é escolhida; (iii) cada árvore é gerada até a máxima extensão possível. Os valores preditos são definidos pela média das predições de todas as árvores. Assim, cada árvore prediz o valor para os compostos que não estão no conjunto treinamento daquela árvore (apenas OOB). O modelo final é escolhido pelo menor erro para predição do conjunto OOB.

3.2.2.4 Implementação dos modelos e uso do aplicativo

O aplicativo para *web*, denominado Pred-Skin, versão 1.0, foi implementado no Ubuntu Server. O aplicativo foi codificado usando Flask (<http://flask.pocoo.org>), uWSGI (<https://uwsgi-docs.readthedocs.org>), Nginx (<http://nginx.org>), Python (<https://www.python.org>), RDKit (<http://www.rdkit.org>), scikit-learn (<http://scikit-learn.org>) e JavaScript (<http://www.ecma-international.org>). O Pred-Skin inclui também o editor molécula JSME escrito em JavaScript (BIENFAIT; ERTL, 2013), que é suportado pelos navegadores *web* mais populares. *Plugins* Java ou Flash não são necessários para usar o aplicativo. Além disso, um aplicativo móvel para iOS (iPhone e iPad) está disponível através da Apple App Store.

O Pred-Skin tem uma nova arquitetura evoluída a partir de um outro aplicativo desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo, denominado Pred-hERG (BRAGA et al., 2014, 2015). O Pred-Skin tem uma interface de usuário intuitiva, onde o usuário pode desenhar uma molécula de interesse ou submeter um arquivo de moléculas em formato sdf ou mol (Figura 5). Como alternativa, o usuário pode colar diretamente a sequência SMILES (do inglês, *simplified molecular-input line-entry system*) da estrutura química a ser predita na área apropriada. Depois de clicar no botão "*Predict*", o usuário receberá o potencial de sensibilização cutânea predito com base nos modelos gerados com dados de dados humanos e de LLNA, bem como os mapas de probabilidade predita para a estrutura (Figura 5). O envio de múltiplas estruturas também é possível clicando na seção "*Bulk Predictions*". Nesse caso, é necessário preencher o formulário que contém o nome de usuário e e-mail. Em seguida, o usuário pode carregar um arquivo sdf/mol contendo até 10.000 compostos. O arquivo será

enviado ao servidor para que o trabalho seja executado; resultados estarão disponíveis para *download* e uma cópia será enviada por e-mail.

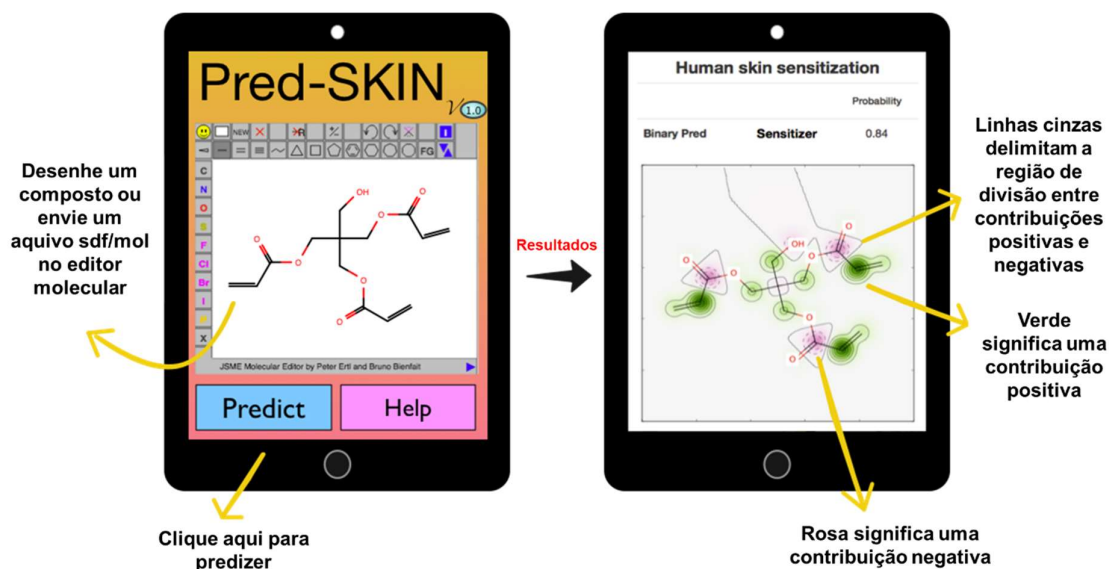


Figura 5. Representação geral para o uso e interpretação dos resultados do aplicativo Pred-Skin.

3.2.2.5 Interpretação dos resultados

O usuário receberá previsões finais de modelos de QSAR com base em dados humanos e LLNA. Para cada modelo, também será fornecido uma figura mostrando como os fragmentos da estrutura foram preditos para contribuir com a atividade. Modelos binários classificam novos compostos como sensibilizador ou não-sensibilizador. Essas previsões são seguidas pela probabilidade da previsão, que é estimada pelo quociente das previsões feitas por modelos internos (árvores no modelo de *Random Forest*) (BREIMAN, 2001). Modelos de potência classificam os compostos em três categorias, seguidas pelas probabilidades da previsão de cada classe: não-sensibilizador, sensibilizador fraco/moderado, ou sensibilizador forte/extremo.

Os mapas de probabilidade predita proporcionam uma visualização gráfica da contribuição de fragmentos estruturais para a atividade derivada dos QSAR modelos desenvolvidos (RINIKER; LANDRUM, 2013). Os átomos são destacados de acordo com sua contribuição de atividade predita. Átomos e fragmentos moleculares destacados em verde representam um aumento no potencial de sensibilização cutânea; os destacados em rosa mostram uma diminuição no potencial de

sensibilização cutânea e em cinza mostram fragmentos indiferentes com nenhuma contribuição para potencial de sensibilização cutânea. Linhas em cinza delimitam a fronteira entre as contribuições positivas (verde) e as contribuições negativas (rosa).

3.3 Parte III: alertas estruturais

3.3.1 Contrastando predições baseadas em alertas e QSAR

A comparação entre alertas estruturais e modelos de QSAR foi realizada utilizando os modelos de QSAR desenvolvidos e publicados anteriormente (ALVES et al., 2015a). Basicamente, esses modelos foram desenvolvidos empregando um conjunto de dados de LLNA contendo 254 estruturas únicas (127 sensibilizadores e 127 não-sensibilizadores). Dois tipos de descritores moleculares foram empregados: um baseado em fragmentos, denominado SiRMS (do inglês, *Simplex Representation of Molecular Structure*) (KUZ'MIN; ARTEMENKO; MURATOV, 2008), e descritores globais 2D usando o *software* DRAGON (TALETE SRL, 2007). Os modelos foram desenvolvidos usando *Random Forest* (BREIMAN, 2001) como método de aprendizado de máquina e foram capazes de discriminar estruturas sensibilizadoras de não-sensibilizadoras com uma taxa de 68-88%.

As predições desses modelos foram utilizadas para comparar com a preditividade de dois programas computacionais que implementam alertas estruturais: o QSAR Toolbox (<https://www.qsartoolbox.org/>) (OECD, 2014) e OCHEM ToxAlerts (<https://ochem.eu/>) (SUSHKO et al., 2012). Para fazer uma comparação justa, usou-se apenas compostos (i) que não estão presentes nos bancos de dados dos programas e (ii) dentro do domínio de aplicabilidade dos modelos de QSAR desenvolvidos. Portanto, 90 compostos (38 sensibilizadores e 52 não-sensibilizadores) foram usados para comparação com QSAR Toolbox, e 246 compostos (160 sensibilizadores e 86 não-sensibilizadores) foram usados para comparação com ToxAlerts.

3.3.2 Aplicação da CBRA

A CBRA (do inglês, *Chemical-Biological Read-Across*) (<https://www.fourches-laboratory.com/software>) é uma técnica de modelagem local que incorpora um esquema de peso de similaridade. Essa técnica se baseia em métricas objetivas para prever a classe de toxicidade de um composto. Além disso, uma vez que a previsão é baseada em um pequeno número de compostos semelhantes, tanto o processo de

modelagem e os seus resultados são transparentes (LOW et al., 2013). Sucintamente, a atividade de um composto é estimada a partir dos conjuntos de dados biológicos (bio) e químicos (qui). Inicialmente, emprega-se dois conjuntos dos vizinhos mais próximos, vizinhos biológicos (k_{bio}) caracterizados em bioensaios e vizinhos químicos (k_{qui}) caracterizados por descritores químicos, para a estimação da atividade de um determinado composto (Equação 9).

$$A_{pred} = \frac{\sum_{i=1}^{k_{bio}} S_i \cdot A_i + \sum_{j=1}^{k_{qui}} S_j \cdot A_j}{\sum_{i=1}^{k_{bio}} S_i + \sum_{j=1}^{k_{qui}} S_j} \quad \text{Equação 9}$$

em que A_{pred} é a atividade predita, S_i a similaridade de Tanimoto estabelecida entre determinado composto e seu i -ésimo vizinho mais próximo. Valores de atividade são estabelecidos entre -1 (inativo) e +1 (ativo), sendo 0 o limiar de classificação.

Os resultados apresentados nesta tese compõem três artigos científicos. Dois artigos foram publicados na revista *Green Chemistry*, referentes à parte I (ALVES et al., 2016a) e III (ALVES et al., 2016b) desta tese. O artigo referente à parte II foi publicado no *Journal of Chemical Information and Modeling* (BRAGA et al., 2017).

Vale ressaltar que termos como "tóxico/não-tóxico", "sensibilizador/não-sensibilizador" e "seguro/não-seguro" foram utilizados nesta tese por simplicidade. Compreende-se plenamente que a definição dos respectivos fenômenos biológicos em termos absolutos é uma simplificação excessiva, uma vez que a atribuição de um produto químico a uma categoria, por exemplo, tóxica ou não-tóxica, depende da dose ou exposição e do limiar de toxicidade designado para uma propriedade particular.

4.1 Parte I: Sensibilização cutânea humana

4.1.1 Análise de duplicados estruturais

Existe uma crescente preocupação pública sobre a irreproducibilidade frequente de dados experimentais relatados em publicações científicas (FRYE et al., 2015). Modelos computacionais são sensíveis à qualidade dos dados utilizados e, por consequência, o preparo do conjunto de dados é imprescindível para se evitar que erros sejam perpetuados e/ou interfiram na preditividade dos modelos (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010, 2015, 2016). Todos os conjuntos de dados utilizados neste estudo passaram por um rigoroso preparo químico e biológico.

4.1.1.1 Sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A)

Quase 50% dos compostos do Conjunto de Dados A (62 de 135) foram associados com vários registros (contabilizando de dois a doze registros por composto). O número de registros e os resultados de todos os ensaios para estes 62 compostos está disponível nos Anexos (Tabela A2). Apenas 28 substâncias de 62 tiveram resultados concordantes para todos os registros. Para se evitar que uma substância tóxica fosse considerada como não-tóxica, todas as substâncias com pelo menos um registro classificando-a como sensibilizadora foram consideradas sensibilizadoras, de acordo com a abordagem de "peso de evidência" adaptada para

a avaliação dos riscos e a falta de dados adicionais na literatura (BURTON; CHAPMAN; SMITH, 2002). Assim, 50 das 62 substâncias foram consideradas sensibilizadoras. Vários compostos com mais de cinco registros (por exemplo, hidroxicitronelal, fenilacetaldéido, e álcool cinâmico,) tiveram grande divergência entre as anotações, revelando a falta de concordância entre os dados disponíveis dos testes humanos. Sabe-se que há grandes diferenças interindividuais na resposta a uma exposição às substâncias químicas. No entanto, muita desta variabilidade já é levada em consideração pelo próprio ensaio em seres humanos, uma vez que os níveis esperados sem efeito de sensibilização são determinados a uma dose abaixo do limiar de sensibilização (BASKETTER; SAFFORD, 2016). Apesar dessa alta variabilidade, modelos foram gerados para esses dados (ver item 3.1.4.4) e as predições analisadas para esses compostos quando eles estavam em conjuntos de validação externa (*folds* externos). Quatro substâncias (ylang ylang, musgo de carvalho, musgo de árvore, e (cloro)metilisotiazolinona [Kathon]) de 34 com anotações divergentes (e, portanto, consideradas como sensibilizadores) foram excluídas da análise por serem misturas. Curiosamente, 22 dos 30 (73%) compostos sensibilizadores restantes foram preditos como sensibilizadores pelos modelos de QSAR.

4.1.1.2 Sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados B)

O conjunto de dados de sensibilização cutânea murina tinha 653 registros para os 135 compostos do Conjunto de Dados A. Verificou-se que apenas 19 dos 76 compostos com múltiplos registros (de 2 a 44 registros) tiveram discordância entre as anotações (Tabela A3, Anexos). Mesmo que alguns compostos tenham tido anotações divergentes, essas geralmente representavam uma pequena fração do número total de registros. Essa observação está de acordo com estudos anteriores que mostram que o LLNA tem uma variância interlaboratorial baixa (SCHOLES et al., 1992; ICCVAM; NICEATM, 1999). Em geral, a variabilidade é maior quando são utilizados solventes diferentes no protocolo seguido (HOFFMANN, 2015; DUMONT et al., 2016).

4.1.2 Análise da concordância de dados de pele humana vs. dados de LLNA

Há um entendimento comum de que os resultados de LLNA se correlacionam com o potencial de sensibilização da pele humana e, portanto, o LLNA tem sido considerado como um método confiável para prever se uma substância química é

esperada para ser sensibilizadora ou não (ICCVAM, 2011; BASKETTER et al., 2014). Por esse motivo, decidiu-se repetir a análise feita pelo ICCVAM em 2011, mas considerando-se apenas compostos com a estrutura química definida (removendo misturas e substâncias inorgânicas), no intuito de analisar as tendências de relação estrutura-atividade. Realizou-se a análise em três níveis: categórico (sensibilizador vs. não-sensibilizador); potência multiclassificatória (sensibilizador extremo/forte, sensibilizador moderado/fraco e não-sensibilizador); e potência contínua (utilizando a concentração em mol/m² para 52 sensibilizadores). A Tabela 1 mostra a matriz da confusão que reflete o grau de concordância entre os dados binários humanos e de LLNA. A preditividade do uso de resultados do LLNA para prever dados humanos é estimada com uma TCC de 63%, sensibilidade de 83%, VPP de 67%, especificidade de 43% e VPN de 65%. A correlação de Pearson (R) entre os dados qualitativos para esses dois pontos finais foi de apenas 28%.

Tabela 1. Resultados experimentais binários de sensibilização cutânea humana vs. LLNA para 109 compostos com estrutura química definida.

		ENSAIO HUMANO		
		Não-sensibilizador	Sensibilizador	Total
LLNA	Não-sensibilizador	20	11	31
	sensibilizador	26	52	78
	Total	46	63	109

Todos os compostos foram divididos em várias classes de acordo com a sua potência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.1.3). Como pode ser observado na Tabela 2, entre 46 não-sensibilizadores em humanos, 24 foram identificados como fracos e dois sensibilizadores como fortes no LLNA. Dez sensibilizadores fracos em humanos são não-sensibilizadores em LLNA, enquanto 29 compostos são fracos e quatro compostos foram sensibilizadores fortes. Um sensibilizador forte em humanos é não-sensibilizador, enquanto doze são sensibilizadores fracos e sete são fortes em LLNA. A correlação de Pearson (R) entre os dados multiclassificatórios foi de apenas 43%.

Tabela 2. Resultados experimentais multiclassificatórios de sensibilização cutânea humana vs. LLNA para 109 compostos com a estrutura química definida.

		ENSAIO HUMANO			
		Não-sensibilizador	Fraco	Forte	Total
LLNA	Não-sensibilizador	20	10	1	31
	Fraco	24	29	12	65
	Forte	2	4	7	13
	Total	46	43	20	109

A potência relativa foi comparada para todos os compostos que eram sensibilizadores tanto em humanos quanto em LLNA. A Figura 6A mostra a distribuição dos sensibilizadores em humanos (DSA_{05}) comparados com LLNA (EC3), ambos expressos em (mol/m^2). O coeficiente de determinação (R^2) para os 52 sensibilizadores foi muito baixo ($R^2 = 0,05$). Mesmo removendo-se três valores discrepantes (lilial, piridina, e benzoato de fenila), como mostrado na Figura 6B, nenhuma melhoria significativa foi observada ($R^2 = 0,08$).

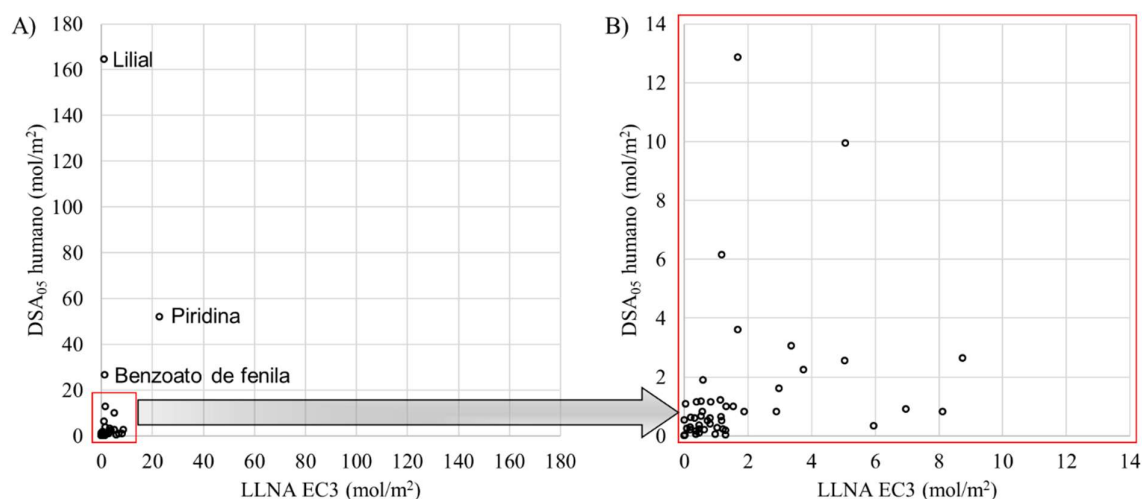


Figura 6. Comparação entre DSA_{05} humano e o EC3 de LLNA para todos os 52 sensibilizadores ($y = 0,3111x + 0,8259$; $R^2 = 0,08$) — painel esquerdo; e 49 sensibilizadores ($y = 2,961 + 1,4383x$; $R^2 = 0,05$) permaneceram após a exclusão de três medidas extremas (lilial, piridina, e benzoato de fenila) — painel direito.

Os altos valores de DSA_{05} para lilial ($164,48 \text{ mol}/\text{m}^2$), piridina ($51,96 \text{ mol}/\text{m}^2$), e benzoato de fenila ($26,5 \text{ mol}/\text{m}^2$) indicam que elas são sensibilizadores fracos (ICCVAM, 2011). Para lilial, o LOEL de $29.528 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($14,48 \text{ mol}/\text{m}^2$) foi também o NOEL num ensaio separado com o menor número de indivíduos. Assim, testando esse

composto em mais indivíduos, observou-se uma resposta de sensibilização pouco frequente. Dois testes adicionais em concentrações mais baixas, com NOEL de 3.750 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1,84 mol/m^2) e 4.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2,02 mol/m^2), renderam nenhum efeito sensibilizante. O relatório do ICCVAM (2011) relata um teste para piridina e benzoato de fenila com LOELs de 34.483 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (43,65 mol/m^2) e 9.448 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (4,77 mol/m^2), respectivamente. Os valores elevados de DSA_{05} para essas substâncias refletem a existência de taxas baixas de sensibilização nas populações testadas com doses relativamente elevadas. Esse fato provavelmente está relacionado com a alta variabilidade interindividual de testes em humanos (BASKETTER; SAFFORD, 2016).

4.1.3 Análise de agrupamentos hierárquicos

A análise de agrupamentos hierárquicos é um método de aprendizado de máquina não supervisionado (os algoritmos são treinados sem definição da variável Y (propriedade biológica), na tentativa de identificar padrões nos conjuntos de dados com base nos descritores). Essa abordagem contribui para a identificação de subgrupos homogêneos entre um conjunto de dados heterogêneo. Alguns dos vários usos dessa abordagem incluem (i) a verificação da diversidade estrutural do conjunto de dados; (ii) a avaliação da consistência de dados experimentais; e (iii) a exploração de possíveis interferências que influenciam na atividade, contribuindo para a revelação de novas regras de relação estrutura-atividade (DOWNS; BARNARD, 2003; MERCIER, 2003).

Nesta seção, apresenta-se uma análise detalhada dos grupos mais interessantes de substâncias químicas estruturalmente semelhantes. O conjunto de dados utilizado neste estudo é pequeno (109 compostos químicos), mas estruturalmente diverso. O principal objetivo da análise de agrupamento foi identificar pequenos grupos de compostos estruturalmente semelhantes, avaliar se todos os compostos químicos dentro de cada grupo têm, como esperado, o efeito de sensibilização cutânea semelhante, o mesmo mecanismo de ação, e comparar o desempenho de predição dos modelos de QSAR e do LLNA para esses compostos. Os compostos foram agrupados utilizando descritores de fragmentos ISIDA e o algoritmo hierárquico do software de ISIDA/Cluster como descrito na seção de Materiais e Métodos (ver item 3.1.4.1). O dendrograma resultante e a matriz de distâncias associados a esse conjunto de dados são apresentados na Figura 7. O dendrograma revela 23 grupos contendo de três a oito compostos estruturalmente semelhantes cada. Um resumo de grupos que mostram o número de compostos

corretamente preditos por QSAR e LLNA no que diz respeito aos dados humanos é mostrado na Tabela 3. As predições individuais e o grupo referente a cada composto está na Tabela A4.

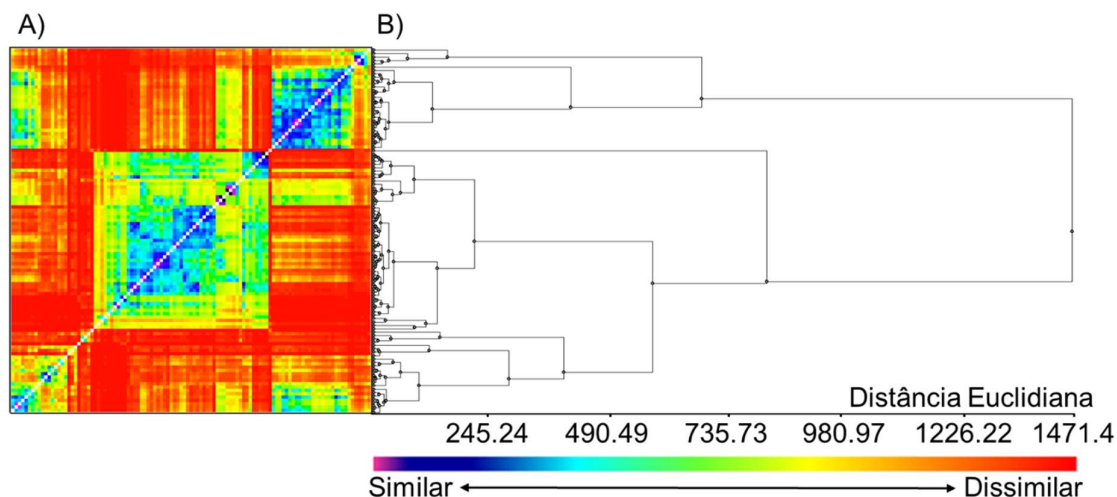


Figura 7. Os resultados da análise de cluster de 109 compostos com dados de sensibilidade da pele humanos. (A) Mapa de calor e (B) dendrograma da matriz de distância, ambos de cor de acordo com a similaridade estrutural (azul / violeta = similar; amarelo / vermelho = diferente).

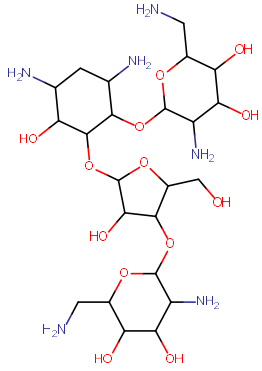
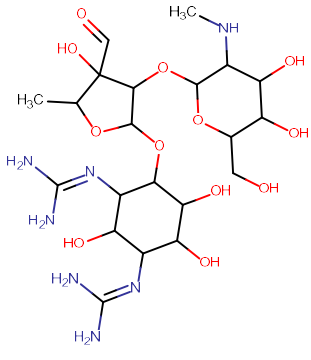
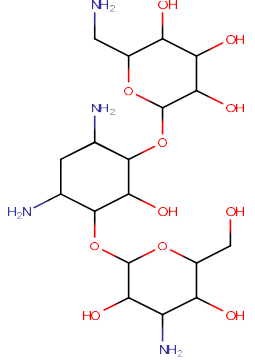
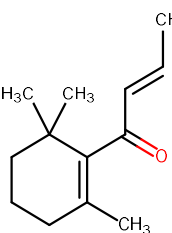
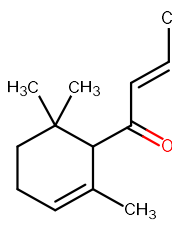
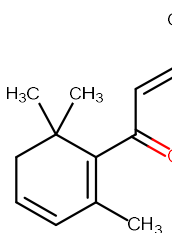
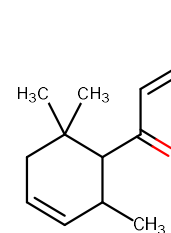
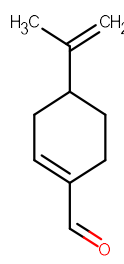
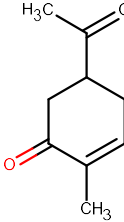
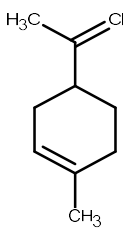
Três grupos (17, 14 e 9, Tabela 4) eram de interesse particular, visto que todos os compostos destes grupos pertenciam à mesma classe química. Três aminoglicosídeos (neomicina, estreptomicina e canamicina) presentes no grupo 17 eram sensibilizadores humanos preditos corretamente pelos modelos de QSAR, mas produziram uma resposta falso-negativa nos ensaios de LLNA. O grupo 14 continha quatro derivados da damascona. Todos os compostos desse grupo eram não-sensibilizadores em seres humanos, exceto a δ -damascona e o isociclogeraniol, ambos erroneamente preditos por QSAR. A δ -damascona foi o único composto corretamente predito por LLNA nesse grupo. Todos os seus análogos altamente semelhantes (damascona, *trans*- α -damascona e *trans*- β -damascona) eram não-sensibilizadores, o que explica por que o modelo de QSAR produziu uma resposta falso-negativa para esse composto. Note-se que, na descrição de tal composto químico, afirma-se que ele "pode causar sensibilização por contato com a pele" (<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1006961.html>), de modo que sua classificação como um sensibilizador pode ser inconclusiva. O grupo 9 é formado por terpenos. Demonstrou-se que alguns terpenos não são alergênicos, mas eles oxidam quando em contato com o ar para produzir compostos alergênicos (MATURA et al.,

2005). Assim, a potência de sensibilização cutânea depende da quantidade de terpenos que contenham impurezas de oxidação. Tal fato explica por que os modelos de QSAR têm predições confusas para essa classe química e sugere que qualquer ensaio, seja *in vivo*, *in vitro*, ou *in silico*, estarão sujeitos ao mesmo problema para alguns compostos dessa classe.

Tabela 3. Resumo da análise de agrupamentos, indicando o número de compostos corretamente preditos por QSAR e LLNA quando comparados com os dados humanos.

Grupo	Sensibilizadores			Não-sensibilizadores		
	Dados humanos	QSAR	Dados de LLNA	Dados humanos	QSAR	Dados de LLNA
1	4	2	3	4	4	1
2	4	4	3	2	0	2
3	2	1	2	4	4	0
4	5	3	4	0	-	-
5	3	2	3	4	3	2
6	4	1	4	2	2	1
7	4	2	3	2	2	2
8	1	0	0	3	3	0
9	3	1	2	1	0	0
10	3	2	3	1	1	1
11	2	2	2	2	0	1
12	3	1	3	1	1	1
13	3	2	3	1	1	1
14	2	0	1	5	5	0
15	1	0	1	2	1	1
16	0	-	-	3	1	2
17	3	3	0	0	-	-
18	3	3	3	0	-	-
19	5	5	5	1	0	1
20	3	3	3	2	1	1
21	1	0	1	4	4	4
22	3	3	3	0	-	-
23	1	1	0	2	2	0
Total	63	41	52	46	35	21

Tabela 4. Dados de pele humana vs. LLNA vs. predições externas de QSAR dentro de grupos químicos selecionados.

Grupo 17				
	Neomicina	Estreptomicina	Canamicina	
	Humano: sensibilizador LLNA: não-sensibilizador QSAR: sensibilizador	Humano: sensibilizador LLNA: não-sensibilizador QSAR: sensibilizador	Humano: sensibilizador LLNA: não-sensibilizador QSAR: sensibilizador	
	<hr/>			
Grupo 14				
	Damascona	trans-α-damascona	trans-β-damascona	δ-damascona
	Humano: não-sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: não-sensibilizador	Humano: não-sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: não-sensibilizador	Humano: não-sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: não-sensibilizador	Humano: sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: não-sensibilizador
	<hr/>			
	Grupo 9			
Perilaldeído		Carvona	d-limonena	Mentadien-7-metil-formato
Humano: sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: sensibilizador		Humano: sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: não-sensibilizador	Humano: não-sensibilizador LLNA: sensibilizador QSAR: sensibilizador	Humano: sensibilizador LLNA: não-sensibilizador QSAR: não-sensibilizador
<hr/>				

O LLNA também tem um elevado desacordo com os dados humanos para não-sensibilizadores presentes no grupo 1. Todos os não-sensibilizadores foram

corretamente preditos por QSAR, embora um dos não-sensibilizadores (resorcinol) foi recentemente identificado como um sensibilizador (BASKETTER et al., 2014). Esse composto é usado em cosméticos em altas concentrações (tintas para cabelo e preparações para a pele), mas não é considerado perigoso, uma vez que possui baixa frequência de sensibilização em humanos (BASKETTER et al., 2014). O álcool benzílico (sensibilizador) também teve concordância errada com LLNA e foi erroneamente predito pelo QSAR. Semelhante aos valores extremos nas seções anteriores, álcool benzílico tem uma elevada DSA_{05} de $48,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($45,06 \text{ mol}/\text{m}^2$) e um NOEL de $5.906 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($5,47 \text{ mol}/\text{m}^2$). A potência muito baixa de sensibilização cutânea pode ser a razão para a predição errada pelo modelo de QSAR. O LLNA também mostrou uma baixa concordância para não-sensibilizadores nos grupos 3 e 8 (que tiveram todos os quatro e três compostos erroneamente preditos, respectivamente). Além disso, o LLNA não foi capaz de prever todos os derivados do cinamil no grupo 8; o álcool α -amilcinâmico foi o único sensibilizador humano e o único composto erroneamente predito por QSAR.

O LLNA tem mostrado resposta concordante com todos os dados humanos em seis dos 23 grupos (grupos 10, 12, 13, 18, 19 e 21). Fora desses seis grupos, apenas o Grupo 10 (terpenoides) e o Grupo 21 (álcoois de cadeia curta), tiveram mais de três compostos pertencentes à mesma classe química. Para esses grupos, o LLNA apresentou maior preditividade dos dados humanos o QSAR, com exceção do Grupo 18. O LLNA também avaliou todas as três cumarinas do grupo 6 corretamente, enquanto QSAR não conseguiu prever a 3,4-dihidrocumarina (sensibilizadora em seres humanos). A não-sensibilizadora 6-metilcumarina foi corretamente predita por QSAR e pelo LLNA. Em um estudo anterior, realizado por nosso grupo (ALVES et al., 2015a), a fonte de dados inicial (ICCVAM, 2009) rotulava a cumarina como não-sensibilizadora. Em um relatório mais recente (ICCVAM, 2011), utilizado no presente trabalho, uma resposta positiva de LLNA foi reportada para a cumarina, embora a referência original (VOCANSON et al., 2006) mostre que a cumarina pura não induz a sensibilização cutânea em camundongos e também é bem tolerada em seres humanos. Em nossa análise anterior (ALVES et al., 2015a), a 3,4-dihidrocumarina foi a única substância sensibilizadora no LLNA dentro do grupo de cumarinas. Outras investigações sugerem que a 3,4-dihidrocumarina é um próhapteno, ou seja, ela precisa sofrer uma biotransformação para causar sensibilização cutânea (GERBERICK et al., 2004). Para adicionar peso de evidência a essa hipótese, decidiu-se analisar possíveis metabólitos da 3,4-dihidrocumarina. Existem uma variedade de

proteínas na pele responsáveis pela biotransformação de substâncias que atingem a derme (SVENSSON, 2009) e uma outra variedade de ferramentas *in silico* que fazem a predição de sítios de metabolismo e possíveis metabólitos. Para essa análise, utilizou-se o servidor MetaPrint 2D-react (<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d-react>) para predizer os principais metabólitos da 3,4-dihidrocurmarina. Um dos metabólitos preditos com alta probabilidade de ocorrer consiste na acetilcisteinação do carbono 6 do anel curmarínico (Figura 8). Essa análise indicou que a 3,4-hidrocurmarina é de fato um possível sensibilizador em seres humanos, não necessitando de biotransformação para se ligar aos resíduos de cisteína em proteínas da pele.

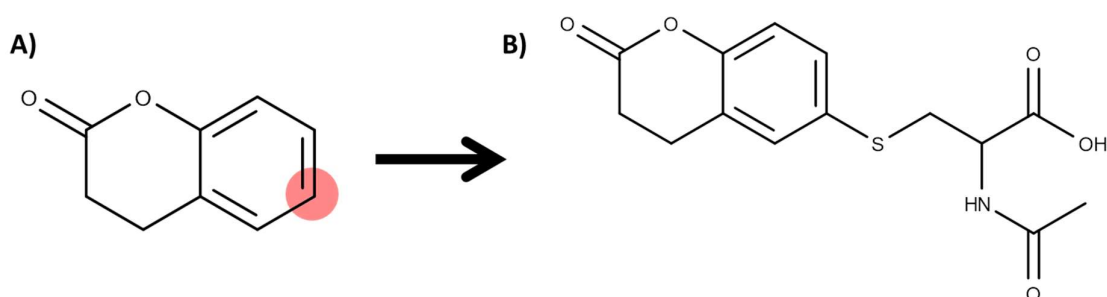


Figura 8. (A) Sítio mais provável de acetilcisteínação da 3,4-dihidrocurmarina representado em vermelho. (B) Metabólito da 3,4-dihidrocurmarina com um resíduo de cisteína.

4.1.4 QSAR e LLNA na predição de sensibilização cutânea humana

Um modelo de QSAR é uma representação teórica, portanto, sua utilidade depende de sua capacidade de generalizar (predizer), com taxa de acerto elevada, determinada atividade biológica ou propriedade de compostos que não foram utilizados para gerar os modelos. Essa capacidade é denominada preditividade. Dois métodos principais são usados para determinar a preditividade dos modelos: validação interna e validação externa. Para a validação externa um conjunto teste não usado na geração dos modelos deve ser utilizado e parâmetros de avaliação devem ser empregados (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; GRAMATICA, 2007). Nesta seção, somente dados de validação externa são reportados.

As características estatísticas dos modelos de QSAR estão resumidas na Tabela 5. Modelos de QSAR foram gerados usando descritores QNA, PASS e globais combinados com o algoritmo RBF-SCR (ZAKHAROV et al., 2014). Foram selecionados os dez melhores modelos para cada *fold*, os quais incluíram apenas

descritores QNA e globais, tais como logP, comprimento topológico da molécula, etc. Descritores biológicos não estavam presentes nos melhores modelos. Modelos de QSAR de consenso apresentaram maior preditividade dos dados humanos do que o LLNA. Embora o LLNA tenha maior sensibilidade (83% vs. 65%) e VPN (69% vs. 61%), os modelos de QSAR desenvolvidos superaram o LLNA em termos gerais, ou seja, na TCC (71% vs. 63%), VPP (79% vs. 67%) e especificidade (76% vs. 43%).

Tabela 5. Características estatísticas dos resultados experimentais do LLNA vs. as predições externas dos modelos de QSAR (validação externa cruzada 5-*fold*) para a predição de sensibilização cutânea humana.

Modelo	TCC	Sensibilidade	VPP	Especificidade	VPN	Cobertura
Modelo de QSAR	0,71	0,65	0,79	0,76	0,61	1,00
Resultado do LLNA	0,63	0,83	0,67	0,43	0,65	1,00
Combinado (QSAR + LLNA)	0,82	0,88	0,90	0,76	0,72	0,52

Apesar de muitos esforços na última década em direção ao desenvolvimento de métodos alternativos de avaliação do potencial de sensibilização cutânea de compostos químicos (ADE et al., 2006; ASHIKAGA et al., 2006; EURL ECVAM, 2013; RAMIREZ et al., 2014; VAN DER VEEN et al., 2014; URBISCH et al., 2014; ALVES et al., 2015a), o LLNA ainda é considerado essencial para a avaliação da potência de sensibilização cutânea em compostos que não possuem dados humanos (BASKETTER et al., 2014). Embora os resultados obtidos tanto em um estudo recente (API; BASKETTER; LALKO, 2014) quanto neste trabalho mostrem que, em certos casos, o LLNA não se correlaciona bem com a potência humana, ele certamente contribui com informação valiosa para a categorização da sensibilização da pele (ICCVAM, 2011). Por outro lado, devido à proibição de testes em animais para a avaliação de produtos cosméticos na Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2013), existe uma forte necessidade de se desenvolver métodos alternativos para a sensibilização cutânea.

No geral, os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que os modelos de QSAR podem prever a sensibilização da pele humana com maior preditividade global do que o LLNA. Notavelmente, a sensibilidade muito alta e especificidade muito

baixa implicam que o LLNA meramente classifica a maioria das moléculas como sensibilizadoras (alta taxa de falsos positivos). Embora a alta sensibilidade desse teste seja importante do ponto de vista da precaução regulatória, a mesma pode levar à retirada de muitos compostos potencialmente úteis e inofensivos no desenvolvimento de fármacos e cosméticos por causa de alertas falsos de sensibilização. Ao mesmo tempo, pode-se observar que os modelos de QSAR desenvolvidos têm alta TCC para prever a sensibilização cutânea de novos compostos que faltam dados de LLNA ou contendo os quimiotipos para o qual o LLNA falhe (ver seção de análise de agrupamentos hierárquicos).

O objetivo final de qualquer método para avaliar a sensibilização cutânea é fornecer uma predição precisa do risco potencial de um composto químico no que diz respeito à segurança humana (BASKETTER et al., 2015). Devido à elevada variabilidade interindividual de testes em humanos, múltiplas fontes de exposição devem ser consideradas para se prover uma avaliação quantitativa dos riscos de sensibilização cutânea (BASKETTER; SAFFORD, 2016). Sabe-se que a predição de consenso normalmente oferece modelos mais preditivos (ZHU et al., 2008; WANG et al., 2008; KUZ'MIN et al., 2009). Assim, decidiu-se combinar as predições de QSAR e os resultados de LLNA para prever a sensibilização da pele humana. Nesse cenário, apenas os casos em que QSAR e LLNA concordaram foram considerados. Casos em que QSAR e LLNA tiveram resultados contraditórios foram tratados como inconclusivos e foram descartados, levando a uma cobertura de 52% (ver Tabela 5). Embora o modelo combinado pudesse realizar predições para apenas cerca de metade de todos os compostos, a preditividade foi muito maior, ou seja, a TCC aumentou de 71 para 82%.

Tais resultados revelam que as predições concordantes entre LLNA e QSAR relativas à sensibilização cutânea humana são da mais alta confiança, mas à custa de uma cobertura reduzida. Em outras palavras, os modelos não poderiam fornecer estimativas para todos os compostos de interesse. No entanto, esses resultados sugerem que, para a avaliação mais confiável, porém conservadora, a abordagem de consenso deve ser preferencialmente usada. Quando houver a necessidade de se avaliar uma grande quantidade de compostos para os potenciais efeitos de sensibilização cutânea humana, os modelos de QSAR gerados com os dados humanos disponíveis devem ser escolhidos em detrimento do LLNA. Os modelos gerados podem ser utilizados em combinação com outras estratégias, como ensaios *in chemico* e *in vitro* (PATLEWICZ et al., 2014; STRICKLAND et al., 2016).

Considerando o pequeno tamanho do conjunto de dados, não foi possível gerar modelos locais com base no mecanismo de ação (mecanismo de ligação com cisteína de proteínas da pele). Contudo, estudos mostram que, geralmente, não há melhoria na preditividade do modelo quando se usa modelos locais ao invés de globais (HELGEE et al., 2010; SHERIDAN, 2014). Assim, o modelo de QSAR apresentado aqui proporciona uma alternativa poderosa às abordagens atuais de animais e *in vitro* para avaliar o efeito de sensibilização cutânea de compostos químicos em humanos.

4.1.5 Otimização estrutural de compostos químicos

Análises de quimioinformática podem ser usadas para determinar características estruturais associadas à toxicidade, a fim de se planejar novos compostos com propriedades melhoradas, quais sejam, menos tóxicas (ALVES et al., 2016b). Ilustra-se aqui um exemplo de otimização estrutural para toxicidade reduzida, usando os dados experimentais e as predições derivadas dos modelos desenvolvidos (Figura 9).

A partir do benzoato de fenila, um sensibilizador da pele humana conhecido, é possível propor compostos estruturalmente semelhantes, que provavelmente partilham as mesmas propriedades de interesse. Em seguida, esses compostos são avaliados quanto ao potencial de sensibilização usando-se os modelos de QSAR. Como pode ser observado na Figura 9, todos os compostos químicos estruturalmente semelhantes escolhidos foram preditos como não-sensibilizadores e, assim, poderiam servir como uma alternativa ao benzoato de fenila. Nesse exemplo, três compostos semelhantes ao benzoato de fenila têm dados humanos e de LLNA (salicilato de benzila, cinamato de benzila, e benzoato de benzila). Todos os três compostos são não-sensibilizadores em humanos e ainda assim mostram resultados positivos em LLNA. Apesar da falta de dados tanto em humanos quanto em LLNA, os compostos restantes apresentados na Figura 9 foram preditos como não-sensibilizadores com base nos resultados dos modelos de QSAR e similaridade química.

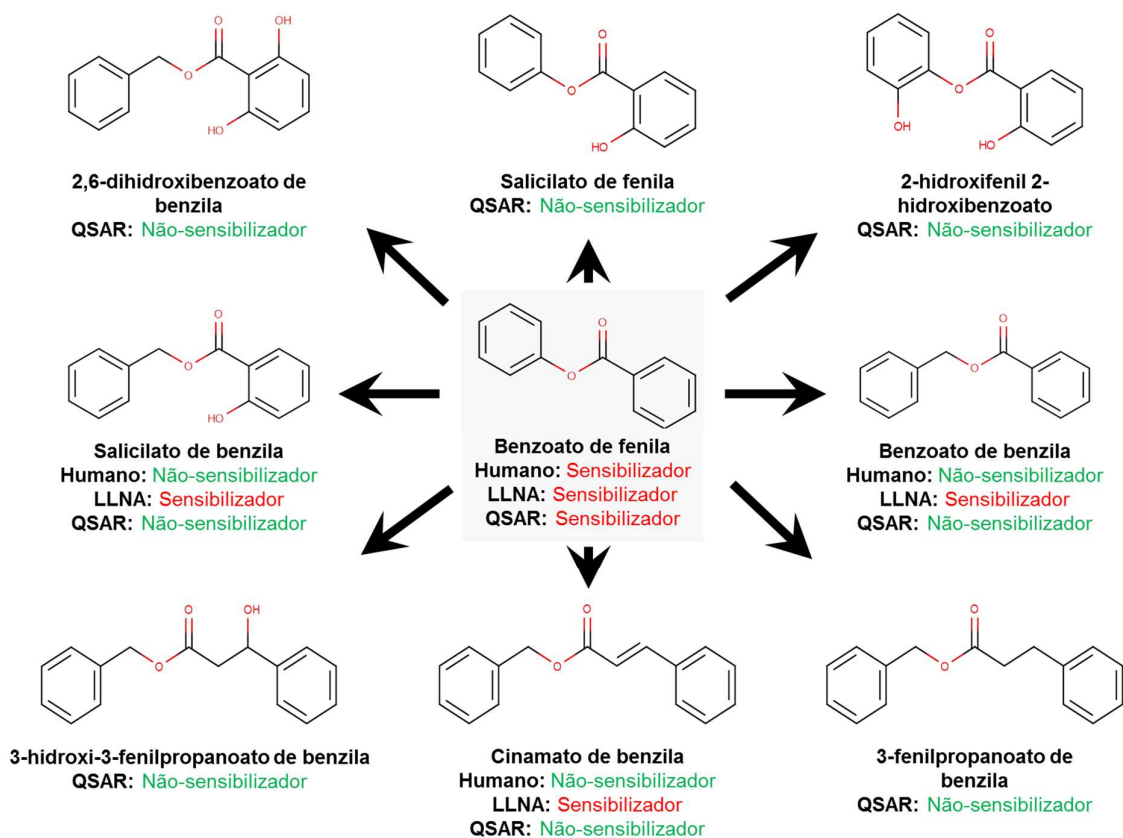


Figura 9. Exemplo de transformação estrutural da sensibilidade de pele humana do benzoato de fenila em vários não-sensibilizadores utilizando modelos de QSAR desenvolvidos.

Em seguida, por meio da interpretação estrutural do modelo de QSAR e análise de agrupamentos hierárquicos, pode-se propor que o potencial tóxico do benzoato de fenila pode ser reduzido através do aumento do comprimento da cadeia entre os anéis de benzeno e/ou uma adição de uma hidroxila na posição *orto* no anel de benzeno. O benzoato de fenila atua como um agente de transferência de acila, reagindo com o enxofre dos resíduos de cisteína de proteínas da pele. As modificações propostas podem resultar em compostos menos reativos porque conduzem a uma carga parcial reduzida no átomo de carbono do grupo carboxilato, o que dificulta a expulsão do oxigênio a partir do intermediário tetraédrico (ROBERTS et al., 2007b). Essa hipótese é reforçada pela análise das contribuições atômicas derivadas da interpretação dos modelos desenvolvidos (Figura 10). Tais contribuições são ilustradas por diferentes cores: vermelho – aumenta o potencial de sensibilização; azul – diminui o potencial de sensibilização; e verde – nenhuma contribuição significativa. Setas verdes

representam maior confiança da predição. Essa maior confiança é influenciada pela ausência de fragmentos, que aumentam o potencial de sensibilização.

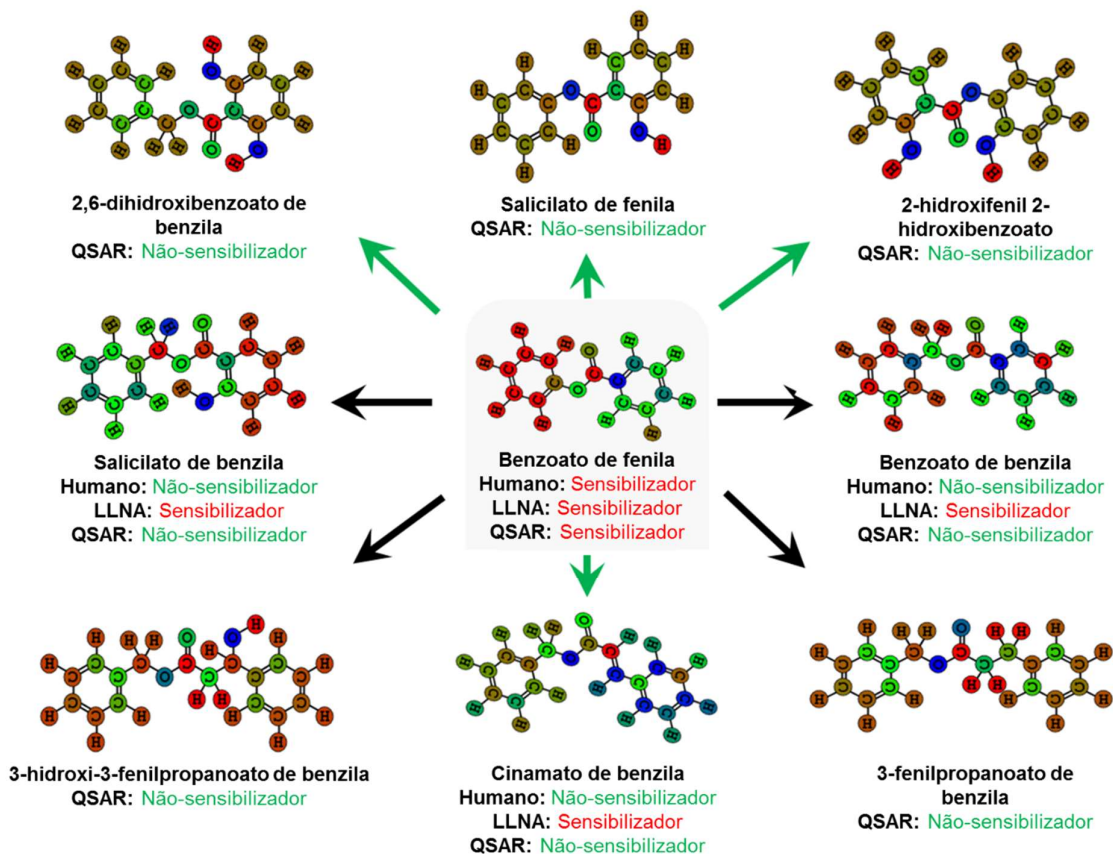


Figura 10. Exemplo de interpretação de modelos de QSAR colorida de acordo com as contribuições de átomos em mudança do potencial de sensibilização: vermelho – aumento de sensibilização; azul – diminuição de sensibilização; verde – nenhuma contribuição significativa. Setas verdes representam maior confiança da predição. Essa informação ajuda a orientar a transformação estrutural da sensibilidade cutânea humana do benzoato de fenila em vários não-sensibilizadores (ver Figura 9).

Outros compostos propostos contêm tais fragmentos; no entanto, sua contribuição global é dominada pelas contribuições negativas de outros fragmentos, resultando na ausência do potencial de sensibilização para as respectivas moléculas. Como pode ser observado na Figura 10, o carbono do carboxilato é levemente mais escuro no salicilato de benzila e no benzoato de benzila, e muito mais verde no cinamato de benzila, indicando que esse átomo foi predito com uma menor influência sobre o potencial de sensibilização cutânea do que o mesmo átomo de carbono do benzoato de fenila. Em outros compostos, embora o carbono de carboxilato tenha sido

predito contribuindo positivamente para a atividade, as contribuições da vizinhança estrutural para o potencial de sensibilização foram muito menores do que no benzoato de fenila. Essa análise fornece outra evidência de que alertas estruturais por si só não são suficientes para sinalizar um composto como tóxico (ALVES et al., 2016b). Essa informação pode ser usada para o planejamento de novos compostos que preservem efeitos específicos desejados do benzoato de fenila, mas removendo a sua ação de sensibilização cutânea.

4.1.6 *Triagem virtual de ingredientes encontrados em cosméticos*

Os modelos de QSAR desenvolvidos foram aplicados à base de dados de cosméticos CosIng (Conjunto de Dados C), a fim de se identificar possíveis sensibilizadores cutâneos. Usando tal modelo, 1.061 compostos foram preditos como sensibilizadores. Como os números de registro no CAS dos compostos químicos no banco de dados CosIng podem corresponder a misturas, gerou-se todos os nomes e números do CAS possíveis para todos os compostos usando o módulo CIR (do inglês, *chemical identifier resolver*) no software KNIME (MAZANETZ et al., 2012). Usando o ChemoText (BAKER; HEMMINGER, 2010), pesquisou-se três termos MeSH associados com a sensibilização cutânea (ver Materiais e Métodos item 3.1.4.5) para as instâncias nas quais os "hits" preditos pelos modelos de QSAR foram mencionados na literatura. Confirmou-se 17 compostos químicos como sensibilizadores cutâneos (ver Tabela 6). Deve-se notar que nem todos os compostos químicos/nomes químicos são indexados no PubMed. Por isso, a maioria dos "hits" não podem ser verificados usando-se o ChemoText.

Tabela 6. Lista de compostos químicos preditos como sensibilizadores e confirmados na literatura.

Nome do composto	CAS	Usos	Referência
Estireno	100-42-5	Perfumes e aromatizantes	(SJÖBORG; FREGERT; TRULSSON, 1984)
Benzonitrila	100-47-0	Perfumes e aromatizantes	(LI; SUJAN; LI, 2004)
<i>p</i> -aminodifenilamina	101-54-2	Produtos de coloração capilar	(SKUDLIK et al., 2011)
Trietileno glicol dimetacrilato	109-16-0	Condicionamento de esmaltes	(PERALE et al., 2005; SHANMUGAM; WILKINSON, 2012)
Etanolamina	141-43-5	Solução tampão	(BHUSHAN; CRAVEN; BECK, 1998)
Dissulfeto de dialila	2179-57-9	Perfumes e aromatizantes	(BORDEL-GÓMEZ; MIRANDA-ROMERO, 2008)

Tabela 6. Continuação.

Nome do composto	CAS	Usos	Referência
Dietileno glicol dimetacrilato	2358-84-1	Condicionamento de esmaltes, formação de filme	(PERALE et al., 2005)
Laureth-9, polidocanol	3055-99-0	Emulsificante	(GALLO et al., 2001)
Gliceril monotioglicolato	30618-84-9	Produtos de cabelo	(LEINO; ESTLANDER; KANERVA, 1998)
Iodopropinil butilcarbamato	55406-53-6	Preservativos químico	(THYSSEN et al., 2010)
Clorexidina	55-56-1	Antimicrobiano, cuidado oral, conservante	(TOHOLKA; NIXON, 2013)
Solvente vermelho CI 3	6535-42-8	Corante	(WANTKE; GÖTZ; JARISCH, 1992)
Cianoacrilato de etila	7085-85-0	Formador de película	(TOMB et al., 1993; SHANMUGAM; WILKINSON, 2012)
Tricloroetano	71-55-6	Solvente	(MALLON; CHU; MAIBACH, 2001)
Cloroacetamida	79-07-2	Preservativo químico	(TARAN; DELANEY, 1997)
Metacrilato de metila	80-62-6	Antifermentante, opacificante	(SHANMUGAM; WILKINSON, 2012; STRAZZULA et al., 2014)
Etilenoglicol dimetacrilato	97-90-5	Condicionamento de esmaltes	(AALTO-KORTE et al., 2008; SHANMUGAM; WILKINSON, 2012)

4.1.7 Considerações finais da parte I

Nesse trabalho, foram compilados e preparados os maiores conjuntos de dados disponíveis ao público de sensibilização cutânea, contendo 135 substâncias (109 estruturas químicas definidas) testadas em ensaios humanos e LLNA. Foi conduzida uma análise de variabilidade e concordância entre os dados humanos e de LLNA usando substâncias com vários resultados de testes. Tal análise mostrou que os dados humanos têm maior variabilidade do que os dados de LLNA e que a concordância entre o ensaio humano e o LLNA foi relativamente baixa (TCC = 28-43%; ver Tabela 1 e Tabela 2).

Foram desenvolvidos e validados modelos de QSAR externamente preditivos para a sensibilização cutânea usando dados humanos disponíveis e avaliados o seu desempenho em comparação com os resultados do LLNA. Em comparação com LLNA, os modelos gerados apresentaram menor sensibilidade (65% vs. 83%), mas TCC superior (71% vs. 63%) e especificidade muito maior (76% vs. 43%). Comparando-se o VPP, observa-se que os modelos gerados tinham uma maior probabilidade (79% vs. 67%) para predizer novos sensibilizadores corretamente. Mais

importante ainda, a combinação conservadora de QSAR e LLNA (*i. e.*, apenas para os compostos com as predições concordantes para ambos os métodos) superou cada uma das abordagens isoladas em até 11%, conforme avaliado por TCC ou VPP, mas à custa de uma redução significativa (por quase 50%) de cobertura do espaço químico. Assim, esses resultados confirmam não só a importância de se combinar métodos experimentais e computacionais para uma avaliação mais precisa da toxicidade química para os seres humanos, mas também sugerem que os modelos de QSAR gerados com dados humanos possuem preditividade significativamente mais elevada para prever efeitos humanos do que o modelo animal preferencial.

Foi empregado um método de agrupamento hierárquico para examinar se compostos químicos similares também têm dados de sensibilização humana semelhantes, como geralmente se espera. Com efeito, para alguns grupos, observou-se a tendência esperada, mas houve também inconsistências, que poderiam ser explicadas por diferenças interindividuais nos dados humanos. Para três grupos maiores de compostos semelhantes (aminoglicosídeos, damasconas e terpenos), o LLNA mostrou fraca concordância com os dados humanos, ao passo que as predições de QSAR foram altamente precisas (Tabela 5 e Tabela A4). Tanto o LLNA quanto o QSAR mostraram preditividade quase aleatória para terpenos, o que poderia ser explicado pelo conhecido fato de que os efeitos na pele são causados pelos metabólitos destes compostos em vez de os serem pelos próprios compostos.

A triagem virtual do banco de dados CosIng incluindo 3.964 produtos químicos empregando os modelos de QSAR gerados nesse trabalho identificou 1.061 potenciais sensibilizadores cutâneos que podem ser candidatos para testes experimentais. A busca de dados pelo ChemoText identificou na literatura 17 novos compostos sensibilizadores que estavam ausentes no conjunto de dados original. Essa análise serve como prova adicional da qualidade preditiva modelo. Note-se que os dados de LLNA para os mesmos compostos estavam indisponíveis, que é uma outra ilustração das vantagens dos modelos de QSAR, que exigem apenas o conhecimento da estrutura química para fazer a avaliação.

4.2 Parte II: desenvolvimento de um aplicativo para web capaz avaliar a sensibilização cutânea de compostos químicos

Desde o início do doutorado, existia um interesse de implementar modelos de QSAR em uma plataforma ou software que pudesse ser usado pela comunidade

científica. O estudo realizado na Parte I prosseguiu, mas os modelos desenvolvidos ali não poderiam ser implementados em um serviço gratuito uma vez que foram desenvolvidos utilizando um software privado. Dessa maneira, houve uma necessidade de desenvolver novos modelos que usassem apenas ferramentas de licença livre. Aqui, descreve-se as características estatísticas dos modelos implementados em um aplicativo para *web* e dispositivos móveis chamado Pred-Skin. Todas as características do aplicativo foram descritas nos materiais e métodos. Vale notar que toda a parte de programação e estruturação do aplicativo foi realizada pelo Dr. Rodolpho de Campos Braga, membro do nosso grupo e colaborador deste trabalho.

4.2.1 Modelos de QSAR gerados para implementação no Pred-Skin

As características estatísticas dos modelos de QSAR binários estão resumidas na Tabela 7. A TCC de modelos binários foi 72-80% para o conjunto de dados humano (Conjunto de Dados A) e 72-84% para o conjunto de dados animal (Conjunto de Dados D). Calculou-se tanto o VPP e o VPN dos modelos binários para se estimar a probabilidade de anotação precisa de um novo composto como um sensibilizador ou não-sensibilizador, respectivamente. Os VPPs foram 72-75% para o conjunto de dados humano e 75-82% para o conjunto de dados murino, com VPNs de 71%-85% e 70%-87%, respectivamente. O uso do DA aumentou a TCC em torno de 8-12%, no entanto, à custa da cobertura do espaço químico (redução de 22-35%).

O modelo para pele humana reportado aqui se sobressaiu àquele apresentado na Parte I em sensibilidade TCC (72% vs. 71%) e sensibilidade (72% vs. 65%) e VPN (69% vs. 61%), ficando atrás em VPP (74% vs. 79%) e especificidade (71% vs. 76%). Dessa maneira, observa-se que o segundo modelo apresenta uma maior taxa de acerto para sensibilizadores, mas a qualidade da predição do primeiro é melhor, devido ao VPP superior. Contudo, essa diferença é pouca e, de maneira geral, o modelo de QSAR baseado em pele humana apresentado na Parte II é superior (aumento de TCC = 1%, sensibilidade = 7%, VPP = 5%, especificidade = 5%, VPN = 8%) àquele apresentado na Parte I. Esse resultado reforça a qualidade de algoritmos de livre acesso, que devem ser priorizados por viabilizar a distribuição gratuita dos modelos.

O trabalho apresentado nesta tese mostra que, em muitos casos, o LLNA não se correlaciona bem com o efeito em seres humanos. Porém, dados humanos são raros e a combinação de modelos de QSAR baseado em pele humana em consenso

com o LLNA mostrou preditividade superior do que esses métodos sozinhos para avaliar dados humanos. Por esse motivo, resolveu-se também implementar modelos de QSAR baseados no LLNA no aplicativo desenvolvido.

Tabela 7. Características estatísticas de modelos de QSAR binários avaliada por validação cruzada externa 5-fold.

Modelo	TCC	Sensibilidade	VPP	Especificidade	VPN	Cobertura
Humano	0,72	0,72	0,74	0,71	0,69	1,00
Humano AD	0,80	0,75	0,75	0,85	0,85	0,65
LLNA	0,72	0,75	0,71	0,70	0,73	1,00
LLNA AD	0,84	0,82	0,80	0,87	0,88	0,66
Consenso	0,75	0,75	0,76	0,75	0,74	1,00
Consenso AD	0,85	0,84	0,82	0,87	0,88	0,60

Reconstruiu-se os modelos murinos baseados em LLNA publicados anteriormente (ALVES et al., 2015a) usando um conjunto de dados maior e apenas descritores químicos de acesso livre para implementar os modelos em um aplicativo. Um modelo de consenso foi gerado através da integração e uma média de predições independentes feitas por modelos de QSAR com base em dados de sensibilidade da pele humanos e LLNA. O modelo de consenso produziu um TCC de 75%. A estimativa do DA para o modelo de consenso proporcionou um TCC maior, de 85%, mas reduziu a cobertura para 60%. No entanto, o consenso entre os modelos de QSAR com base em dados humanos e em dados de LLNA proporcionou maior preditividade do que os modelos individuais sozinhos.

Embora não tenha sido possível gerar modelos multiclassificatórios com base em dados humanos, devido ao número relativamente pequeno de compostos (109), modelos multiclassificatórios com base em LLNA foram gerados. O desempenho desses modelos é apresentado na Tabela 8. A acurácia dos modelos multiclassificatórios de LLNA foi 73-76%. Estes modelos oferecem uma ferramenta inovadora para classificar sensibilizadores da pele nas seguintes categorias de potência: não-sensibilizadores, sensibilizadores fracos/moderados e sensibilizadores fortes/extremos. Modelos multiclassificatórios representam um avanço na predição computacional de sensibilização cutânea, uma vez que nenhum dos estudos anteriores foram bem-sucedidos no desenvolvimento deste tipo de modelos.

Tabela 8. Características estatísticas de modelos de QSAR multiclassificatórios avaliada por validação cruzada externa 5-fold.

Model	Acurácia	Precisão	Recall	Cobertura
LLNA Multiclasse	0,73	0,73	0,73	1,00
LLNA Multiclasse AD	0,76	0,75	0,76	0,78

4.2.2 Interpretação dos resultados para otimização de compostos

Além das avaliações feitas pelos modelos de QSAR, o Pred-Skin dispõe de um recurso de análise visual denominado mapas de probabilidade predita (Figura 11). Esse recurso fornece uma visualização gráfica da contribuição de fragmentos estruturais para a atividade derivada de modelos QSAR desenvolvidos (RINIKER; LANDRUM, 2013). Os átomos são destacados de acordo com sua contribuição de atividade predita. Átomos e fragmentos moleculares destacados em verde representam um aumento no potencial de sensibilização cutânea; os destacados em rosa mostram uma diminuição no potencial de sensibilização cutânea e em cinza mostram fragmentos indiferentes com nenhuma contribuição para potencial de sensibilização cutânea. Linhas em cinza delimitam a fronteira entre as contribuições positivas (verde) e as contribuições negativas (rosa).

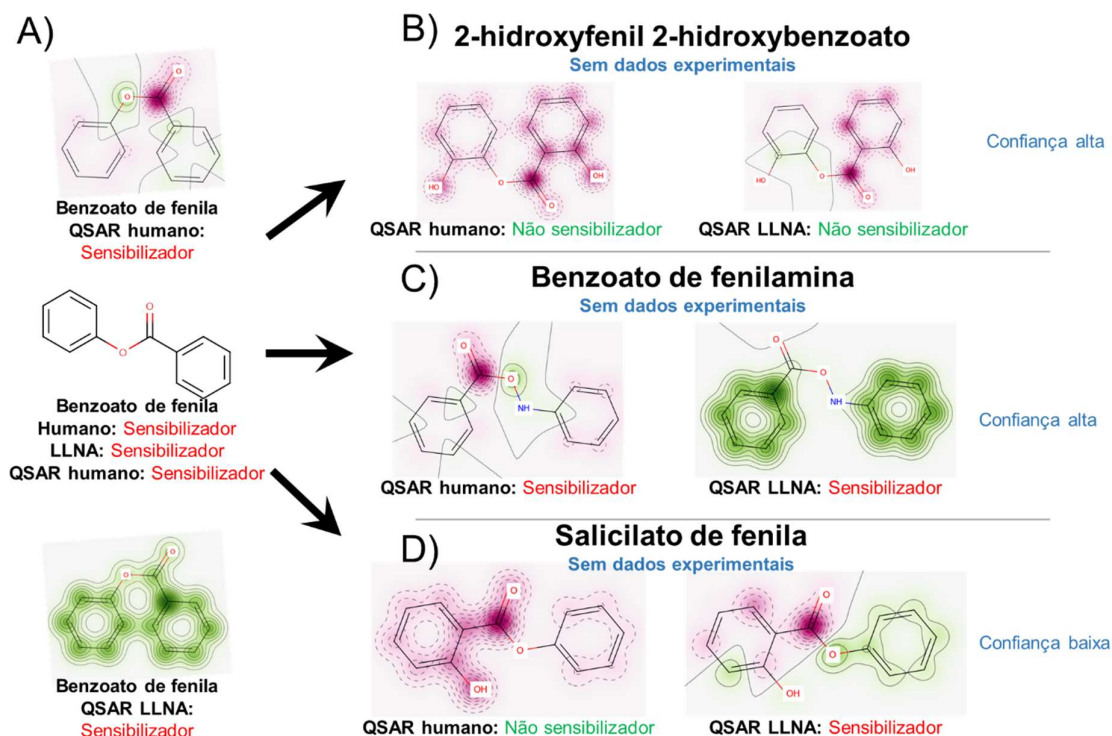


Figura 11. Planejamento de compostos potencialmente menos tóxicos usando o Pred-Skin. A partir de um composto sensibilizador (A), com dados experimentais em seres

humanos, o usuário faz predições de compostos análogos que carecem de dados experimentais. Quando os modelos baseados em dados humanos e LLNA concordam (B-C), há uma maior confiança das predições do que quando eles discordam (D). Caso os modelos discordem, aquele baseado em dados humanos devem ser priorizados.

A grande vantagem desses mapas consiste na praticidade para interpretar quais subestruturas moleculares contribuem para determinada atividade e, dessa forma, propor modificações moleculares que levem a estruturas potencialmente menos tóxicas. No Pred-Skin foram implementados mapas tanto para os modelos baseados em pele humana quanto no LLNA. Para otimização de compostos, o usuário faz a predição inicial de um composto sensibilizador que tenha dados experimentais (Figura 11A). O usuário propõe novas estruturas e faz novas predições. Quando os modelos baseados em dados humanos e LLNA concordam (B-C), há uma maior confiança das predições do que quando eles discordam (D). Caso os modelos discordem, aquele baseado em dados humanos devem ser priorizados.

4.2.3 Considerações finais da Parte II

O aplicativo Pred-Skin é uma ferramenta rápida, confiável e de fácil utilização para avaliação precoce da sensibilização cutânea induzida quimicamente. O aplicativo fornece um método simples para os usuários fazerem predições usando modelos de QSAR validados externamente para sensibilização cutânea com base em dados humanos e murinos. As predições para um único composto são realizadas em menos de um segundo. O aplicativo não requer habilidades computacionais ou de programação do usuário. Os seguintes resultados são fornecidos: (i) as predições binárias de sensibilização cutânea humana e de murina; (ii) predições multiclassificatórias da potência de sensibilização cutânea murina; e (iii) mapas de probabilidade que ilustram a contribuição predita de fragmentos químicos. O Pred-Skin será continuamente atualizado e melhorado quando estiverem disponíveis novos dados. O aplicativo está disponível gratuitamente para o público em <http://www.labmol.com.br/predskin>.

4.3 Parte III: Alertas estruturais

Nesta parte do trabalho, comparou-se as duas principais abordagens modernas para avaliação de toxicidade na intenção de revelar suas diferenças e propor uma forma de combinar as mesmas. Os resultados apresentados aqui constituem parte de

uma perspectiva elaborada no intuito de alertar a comunidade científica sobre os riscos de se usar alertas estruturais para fazer predições e propor uma maneira racional de uso dos mesmos. Aqui, (i) relata-se a investigação da confiabilidade de alertas estruturais para sensibilização cutânea; (ii) destaca-se as vantagens e desvantagens de alertas estruturais e modelos de QSAR; (iii) alerta-se usuários sobre o perigo de usar alertas estruturais como único preditor de toxicidade; e (iv) propõe-se um novo fluxo de trabalho para predição da toxicidade que integre regras de relação estrutura-atividade e alertas estruturais para aumentar tanto a transparência quanto precisão das predições.

4.3.1 Qual a confiabilidade de alertas estruturais para predizer a toxicidade?

Como mencionado na introdução, os alertas estruturais têm sido amplamente aceitos devido à sua facilidade de interpretação. Contudo, estudos tem questionado a utilidade de alertas para a avaliação precisa da toxicidade de compostos químicos. Uma preocupação óbvia é que a maioria dos alertas representam grupos funcionais ou subestruturas que podem ser encontrados em muitos compostos, tanto tóxicos quanto não-tóxicos, levando a predições com alta sensibilidade, mas baixa especificidade (STEPAN et al., 2011). Como será discutido a seguir, tal fenômeno pode ocorrer devido ao fato de as propriedades químicas das subestruturas dependerem de outros grupos na molécula, que podem influenciar a reatividade da subestrutura definida como alerta estrutural.

A baixa precisão na predição de propriedades toxicológicas tem causado controvérsia na avaliação do poder de alertas por parte da comunidade científica. A OECD caracteriza a comparação de análogos químicos por interpolação como uma técnica usada para predizer uma determinada propriedade, mas exige a elaboração de parecer por especialistas e ressalta que uma justificativa deve ser elaborada (OECD, [s.d.]). Essa mesma instituição patrocinou o desenvolvimento um software denominado QSAR Toolbox (OECD, 2014), uma aplicação para predizer várias propriedades de (eco)toxicidade com base em alertas estruturais, grupos químicos e comparação de análogos químicos por interpolação (OECD, 2009b).

Outro software, Toxtree (<http://toxtree.sourceforge.net/>), possui um módulo de sensibilização da pele que implementa alertas (ENOCH et al., 2008). Contribuindo para a confusão sobre o significado de alertas como preditores de toxicidade, os desenvolvedores do Toxtree recentemente colocaram uma declaração em sua página na *web*, relatando que mudaram o nome do módulo de "alertas de sensibilização

cutânea" para "domínio de reatividade de sensibilização cutânea", explicando que os alertas só fornecem agrupamento em mecanismos de ação e não são capazes de prever o potencial de sensibilização cutânea (TOXTREE, [s.d.]). Embora não relatados de forma explícita, essa mudança visível na nomenclatura deve-se provavelmente a dificuldades e deficiências do método.

Em outro exemplo, Hewitt e colaboradores (2013) desenvolveram novos alertas estruturais para hepatotoxicidade. Eles observaram que muitos alertas foram igualmente presentes em medicamentos não hepatotóxicos. Ironicamente, os autores ainda declararam que eles desenvolveram um sistema capaz de gerar alertas estruturais baseados no mecanismo de ação adequados para a identificação de substâncias com potencial hepatotóxico. No entanto, reconhecendo a contradição inerente de suas descobertas, eles afirmaram que esses alertas não constituem um modelo a ser usado para a predição de hepatotoxicidade. Em outro estudo (PIZZO et al., 2015), os autores não puderam atribuir um modo inequívoco de ação para a maioria dos alertas identificados para a toxicidade hepática e renal. No artigo descrevendo o servidor ToxAlerts (SUSHKO et al., 2012), os desenvolvedores têm comentado sobre a limitação dos alertas como uma técnica útil para sinalizar compostos potencialmente tóxicos, mas não necessariamente prever a toxicidade.

4.3.2 *Contrastando predições baseadas em alertas e QSAR*

Em estudos anteriores aos reportados nesta tese, foram desenvolvidos modelos de QSAR para sensibilização cutânea baseados em dados de LLNA. Os resultados provenientes desses estudos foram reportados em minha dissertação de mestrado (ALVES, 2014) e em dois artigos científicos (ALVES et al., 2015a, 2015b). Aqui, reporta-se a aplicação desses mesmos modelos para fazer uma comparação com duas ferramentas que utilizam alertas estruturais: QSAR Toolbox (OECD, 2014) e o servidor *web* ToxAlerts (SUSHKO et al., 2012). Esses modelos não serão descritos aqui, visto que já se encontram descritos na literatura. Eles foram utilizados devido à ausência de módulos de alertas estruturais que empregassem dados de pele humana.

A sensibilização cutânea representa um valioso exemplo ilustrativo para contrastar os resultados da modelagem de QSAR e abordagens baseadas em alertas estruturais, uma vez que é uma das propriedades toxicológicas priorizadas pela OECD. O QSAR Toolbox, desenvolvido pela OECD, tem um módulo específico para a sensibilização cutânea baseado em alertas estruturais, o que permite uma comparação direta entre esse método e o QSAR (OECD, 2014).

Para fazer uma comparação justa, usou-se apenas compostos (i) que não estão presentes nos bancos de dados dos softwares e (ii) dentro do domínio de aplicabilidade modelos de QSAR desenvolvidos. Portanto, 90 compostos (38 sensibilizadores e 52 não-sensibilizadores) foram usados para comparação com QSAR Toolbox, e 246 compostos (160 sensibilizadores e 86 não-sensibilizadores) foram usados para comparação com ToxAlerts. Os modelos de QSAR mostraram uma qualidade preditiva significativamente maior para os mesmos conjuntos de compostos externos quando comparado com ambas as ferramentas baseadas em alertas avaliada pelo VPP especificidade, VPN e TCC (Tabela 9). Embora as predições feitas com QSAR Toolbox e ToxAlerts apresentem maior sensibilidade do que os modelos de QSAR ao avaliar o mesmo conjunto de estruturas, os modelos desenvolvidos apresentam um VPP muito maior. Estes resultados indicam que a probabilidade de classificar sensibilizadores corretamente é muito mais elevada utilizando modelos de QSAR do que as predições baseadas em alertas, que são extremamente tendenciosas em prever sensibilizadores.

Tabela 9. Comparação das precisões de predição dos modelos de QSAR, módulo de sensibilização cutânea do QSAR Toolbox e ToxAlerts.

QSAR Toolbox					
QSAR vs. ferramenta de alerta	TCC	Sensibilidade	VPP	Especificidade	VPN
QSAR	0,74	0,50	0,94	0,98	0,75
QSAR Toolbox	0,46	0,53	0,38	0,38	0,53
ToxAlerts					
QSAR vs. ferramenta de alerta	TCC	Sensibilidade	VPP	Especificidade	VPN
QSAR	0,80	0,74	0,90	0,85	0,64
ToxAlerts	0,60	0,84	0,71	0,36	0,55

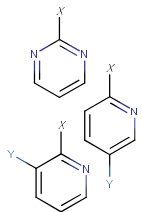
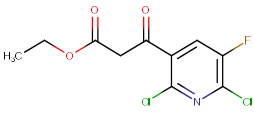
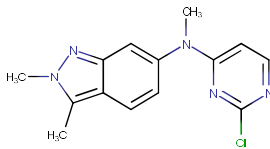
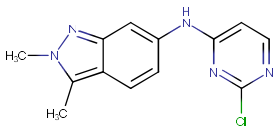
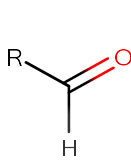
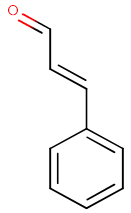
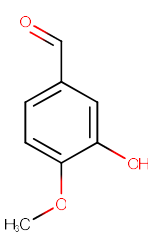
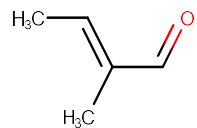
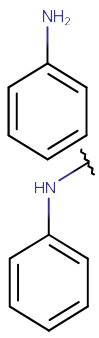
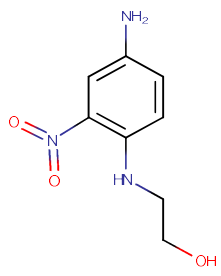
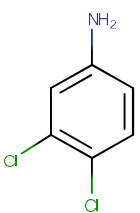
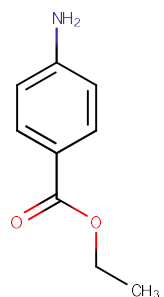
Na Tabela 10, apresenta-se três exemplos de alertas estruturais sinalizados pelo QSAR Toolbox ou por ToxAlerts: piridina/pirimidina ativada, grupo formil (aldeídos), e aminas aromáticas. Além disso, comparou-se a avaliação da toxicidade experimental com as predições obtidas pelos modelos de QSAR para compostos contendo as subestruturas de alerta obtidos por QSAR Toolbox ou ToxAlerts.

Como se pode observar, todos os compostos contendo uma subestrutura de piridina/pirimidina ativada são não-sensibilizadores em ensaios de LLNA. Esses compostos foram sinalizados como sensibilizadores pelo QSAR Toolbox, mas preditos corretamente como não-sensibilizadores pelos modelos de QSAR. As moléculas que

contêm dois outros alertas sinalizados pelo ToxAlerts (grupo formil e aminas aromáticas) não são sempre os sensibilizadores: por exemplo o 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (predito corretamente por QSAR como um não-sensibilizador) e (2*E*)-2-metil-2-butenal (predito de forma incorreta por QSAR como um sensibilizador) que contêm o grupo formil. Foram também identificados os seguintes não-sensibilizadores contendo cinco ou mais alertas cada: 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído, vanilina (dez alertas ambos), e etil vanilina (nove alertas) (lista completa no material suplementar em (ALVES et al., 2016b)). Esses resultados evidenciam que mesmo a presença de vários alertas estruturais para sensibilização cutânea não sugere automaticamente que os respectivos compostos sejam tóxicos e, como tal, devam ser evitados em produtos comerciais. Ao mesmo tempo, esses resultados mostram que os modelos de QSAR validados externamente proporcionam uma maior preditividade na avaliação da toxicidade química do que os alertas estruturais.

Alertas estruturais destacam a importância de características estruturais específicas como determinantes da toxicidade de um composto. No entanto, seus efeitos biológicos são medidos para as moléculas inteiras, levantando dúvidas acerca da possibilidade de um fragmento poder sempre definir adequadamente a propriedade de toda a molécula (ENOCH; ROBERTS, 2013). Dessa forma, observa-se que a toxicidade de um composto pode ser substancialmente afetada pela interferência mútua entre seus componentes estruturais. Além disso, subestruturas individuais não estão agindo diretamente e de forma independente, como é presumido pelo conceito de alertas estruturais. Em vez disso, várias subestruturas, incluindo até vizinhos distantes, podem influenciar mutuamente suas contribuições. A interpretação dos modelos de QSAR pode contribuir não só para encontrar tais subestruturas, mas também para identificar os seus vizinhos preferenciais e a sua posição relativa na molécula para aumentar ou diminuir as propriedades desejadas e não desejadas da molécula, respectivamente, que proporciona um caminho para o planejamento de compostos com propriedades desejadas.

Tabela 10. Exemplos de alertas estruturais e comparação dos efeitos experimentais e preditos de sensibilização cutânea para compostos contendo alerta.

Alertas	Compostos contendo alertas estruturais		
			
<p>Piridina/ pirimidina ativada QSAR Toolbox</p>	<p>Acetato de 2,6- dicloro-5-fluoro-β- oxo-3- piridinopropanoato LLNA: não- sensibilizador QSAR: não- sensibilizador QSAR Toolbox: sensibilizador</p>	<p>N-(2-cloro-4- pirimidinil)-N-2,3- trimetil-2H-indazol-6- amina LLNA: não- sensibilizador QSAR: não- sensibilizador QSAR Toolbox: sensibilizador</p>	<p>N-(2-cloro-4-pirimidinil)- 2,3-dimetil-2H-indazol- 6-amina LLNA: não-sensibilizador QSAR: não- sensibilizador QSAR Toolbox: sensibilizador</p>
			
<p>Formil OCHEM ID: TA264</p>	<p>Aldeído cinâmico LLNA: Sensibilizador ToxAlerts: sensibilizador QSAR: Sensibilizador</p>	<p>3-hidroxi-4- metoxibenzaldeído LLNA: Não- sensibilizador ToxAlerts: sensibilizador QSAR: Não- sensibilizador</p>	<p>(2E) -2-metil-2-butenal LLNA: Não-sensibilizador ToxAlerts: sensibilizador QSAR: Sensibilizador</p>
			
<p>Aminas aromáticas OCHEM ID: TA311</p>	<p>2-(4-amino-2-nitro- fenilamino) -etanol LLNA: Sensibilizador ToxAlerts: sensibilizador QSAR: Sensibilizador</p>	<p>3,4-dicloroanilina LLNA: Sensibilizador ToxAlerts: sensibilizador QSAR: Não- sensibilizador</p>	<p>Benzocaina LLNA: Não-sensibilizador ToxAlerts: sensibilizador QSAR: Não- sensibilizador</p>

4.3.3 Interpretando modelos de QSAR

Um benefício importante da análise de quimioinformática é o uso de alertas estruturais estabelecidos a partir da interpretação de modelos de QSAR e/ou análise de agrupamentos hierárquicos para projetar novos compostos com características melhoradas. Embora a modelagem de QSAR seja normalmente referida como uma "caixa preta", muitos estudos têm mostrado que os modelos podem de fato ser interpretados em termos de características estruturais responsáveis pela atividade ou toxicidade (BASKIN et al., 2002; TROPSHA; GRAMATICA; GOMBAR, 2003; AJMANI; JADHAV; KULKARNI, 2006; KUZ'MIN et al., 2011; STANTON, 2012; POLISHCHUK et al., 2013; CHERKASOV et al., 2014).

Mesmo modelos desenvolvidos com descritores complexos, como DRAGON (TALETE SRL, 2007) são passíveis de interpretação. A interpretação é feita analisando-se os descritores mais importantes para o modelo. Descritores baseados em fragmentos ou em *fingerprints* moleculares são mais fáceis, visto que os descritores correspondem com os fragmentos mais importantes para a atividade (KUZ'MIN et al., 2011). No caso do DRAGON, existe um manual que explica cada um desses descritores (TODESCHINI; CONSONNI, 2009) e que pode ser consultado. Alguns métodos demonstram a contribuição dos átomos diretamente na estrutura avaliada, o que permite uma fácil visualização da contribuição dos fragmentos nesta estrutura química.

Nesse trabalho, como representado na Figura 10, os modelos foram interpretados, primeiramente, através da análise de agrupamentos hierárquicos, observando estruturas similares e, posteriormente, observando-se a contribuição de cada átomo fragmento conforme preditos pelos modelos. A Figura 10 mostra que uma pequena alteração, como a introdução de uma hidroxila ou um metileno espaçando subestruturas maiores podem influenciar significativamente na atividade da molécula.

Da interpretação de modelos devidamente validados podem resultar alertas estruturais estatisticamente significativos, os quais podem ser muito úteis no planejamento molecular de novos compostos com propriedades desejadas. Ao interpretar modelos desenvolvidos (POLISHCHUK et al., 2013), pode-se obter *insights* sobre as características estruturais responsáveis pela afinidade de interação de ligantes com receptores e orientar modificações estruturais que modulam sua afinidade de ligação.

4.3.4 Integrando QSAR e alertas estruturais

A ligação com proteínas da pele é um evento importante para a sensibilização cutânea. Alertas de ligação com proteínas são baseadas em princípios de química orgânica bem estabelecidos, contudo, por si só não podem prever sensibilizadores da pele de forma eficiente. No entanto, se existirem dados suficientes, os alertas podem ser usados para a atribuição de um mecanismo de ação para investigar e desenvolver modelos de QSAR locais. Nesse caso, esses modelos locais podem ser unidos com um modelo global em um consenso, que, normalmente, terão poder preditivo comparável ou superior (DEARDEN et al., 2015).

Outra abordagem para superar os inconvenientes de alertas estruturais individuais é a CBRA (LOW et al., 2013), que infere a atividade de um composto baseado em seus análogos químicos e biológicos. A CBRA avalia a semelhança entre substâncias químicas com base em (i) propriedades estruturais calculadas classicamente consideradas como descritores químicos ou (ii) resultados experimentalmente obtidos ou preditos de avaliações biológicas consideradas como descritores biológicos. A CBRA combina a simplicidade e a transparência da comparação de análogos por interpolação, agrupando compostos semelhantes, com métodos mais sofisticados, como a modelagem de conjunto e aprendizagem baseada em instâncias.

Como exemplo, usou-se um composto sensibilizador, o eugenol. Resultados de ensaios biológicos realizados em triagem automatizada em larga escala disponíveis na base de dados ToxCast (<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecasting>) (DIX et al., 2007) foram compilados para esse composto e usado como descritores biológicos. Os descritores químicos foram calculados utilizando o DRAGON. A CBRA pode ser representada visualmente como uma trama radial (ver Figura 7). O composto de interesse é representado por um grande nó central rodeado por nós adicionais que representam os k vizinhos mais próximos no espaço biológico (lado esquerdo) e no espaço químico (lado direito). Cada vizinho do nó é colorido com base em sua atividade observada (por exemplo, vermelho = tóxico, verde = não-tóxico). A posição relativa de cada nó-vizinho do composto nó-central baseia-se na similaridade definida pelo coeficiente de Tanimoto entre esses dois compostos: os vizinhos mais próximos, tanto em espaço químico quanto biológico, são dispostos mais altos e ao centro.

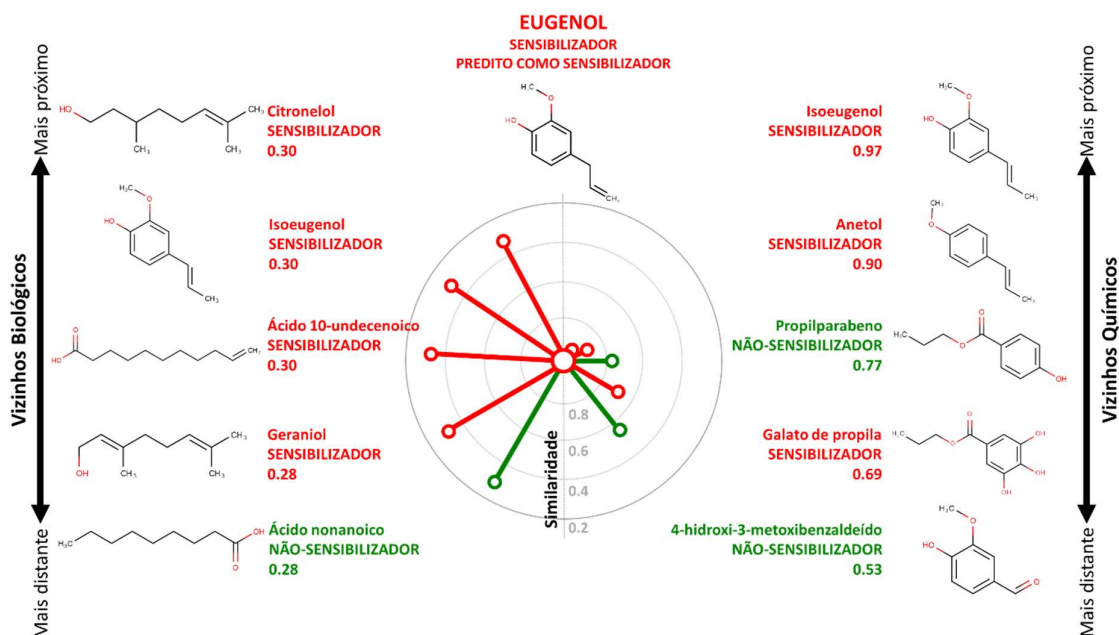


Figura 12. Representação gráfica da aplicação de CBRA para o eugenol (sensibilizador). O nó central representa o composto alvo (eugenol) rodeado por vizinhos biológicos (lado esquerdo) e químicos (lado direito). A similaridade de Tanimoto é utilizada para posicionar os vizinhos para o composto alvo. Bordas e nós são coloridas de acordo com a classificação da atividade conhecida (vermelho = tóxico, verde = não-tóxico).

4.3.5 Considerações finais da Parte III

Como foi demonstrado no item 4.3.2, alertas estruturais são extremamente hipersensíveis (tendem a apresentar elevada quantidade de falsos positivos). Se usados sozinhos para prever a atividade biológica, seu uso pode ser prejudicial tanto para a avaliação da toxicidade quanto no planejamento de fármacos. Contudo, alertas estruturais, quando validados estatisticamente por modelos de QSAR, podem contribuir para o planejamento de compostos mais seguros. Em resumo, no lugar do *status quo* mostrado na Figura 1, propõe-se uma abordagem integrada para a avaliação de toxicidade de novos produtos químicos que utilizam ambos os alertas estruturais e modelos de QSAR (Figura 8). Nesta abordagem, os alertas servem como hipóteses transparentes (que poderiam ser derivados por análise de relação estrutura-atividade tradicional ou interpretação do modelo) que podem ser reforçados ou refutados por modelos de QSAR estatisticamente significativos e validados externamente. Qualquer alerta deve ser considerado como uma hipótese estrutural da

ação química, mas seu poder de predição deve ser sustentado por predições de QSAR e, se possível, pela validação experimental.

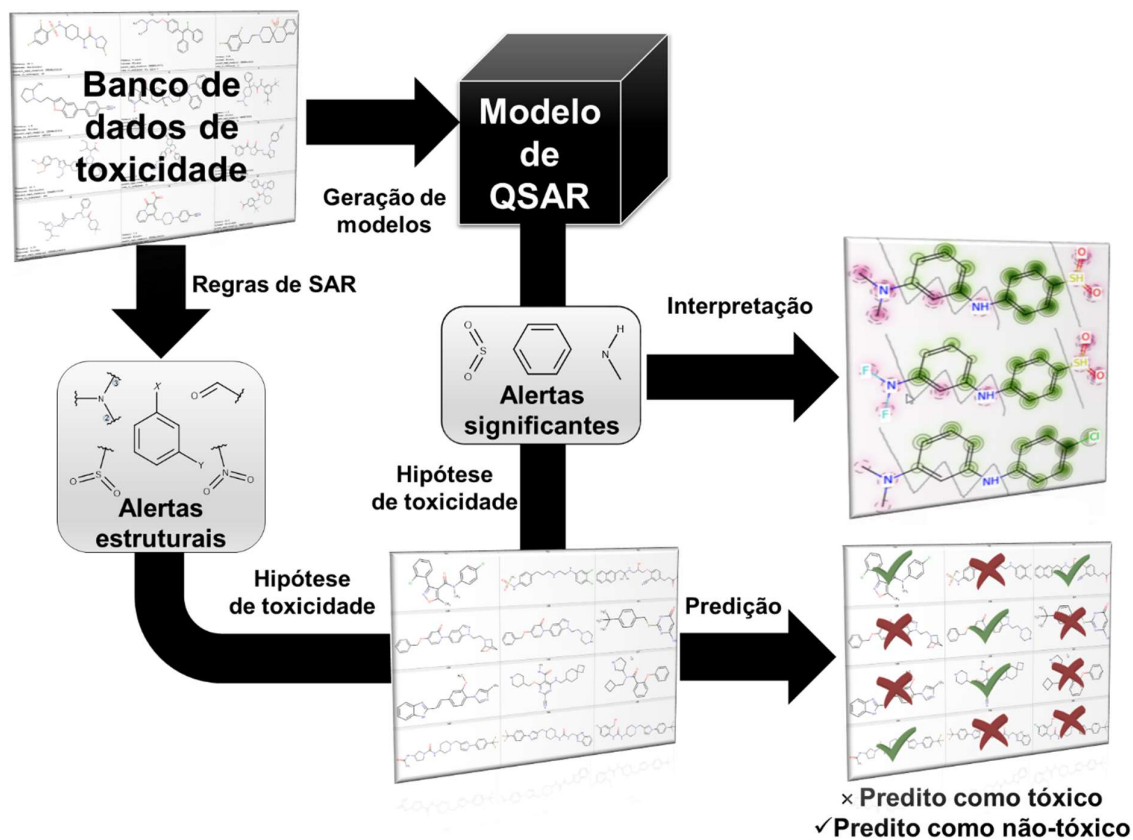


Figura 13. Proposta de abordagem integrada para a avaliação da toxicidade de novas substâncias através da combinação de alertas estruturais e modelos de QSAR.

As análises realizadas nessa tese foram importantes para se avaliar as vantagens e desvantagens tanto do modelo animal preferencial (LLNA) quanto de modelos de QSAR baseados em pele humana para prever os efeitos de sensibilização cutânea humana. Tal análise mostrou que a concordância entre o ensaio humano e o LLNA foi relativamente baixa (TCC = 28-43%; ver Tabela 1 e Tabela 2), o que reforça a necessidade de se desenvolver métodos alternativos para sensibilização cutânea. Os resultados reportados representam um grande avanço científico no desenvolvimento de métodos *in silico* para a avaliação da sensibilização cutânea, visto que não há registros na literatura de modelos de QSAR baseados em dados de pele humana. Em consequência, não há softwares ou servidores *web* que implementem modelos semelhantes para uso da comunidade científica. Além disso, esse trabalho é o primeiro a descrever modelos de QSAR multiclassificatórios desenvolvidos com base no LLNA.

O aplicativo Pred-Skin consiste em um produto tecnológico para avaliação da sensibilização cutânea. Ele oferece à comunidade científica uma maneira rápida, confiável e de fácil utilização para a avaliação da sensibilização cutânea de compostos químicos sem dados experimentais. Ele é inovador por (i) ser o primeiro software que implementa modelos de QSAR baseados em pele humana e modelos multiclassificatórios para LLNA e por (ii) ser o primeiro software que permite visualizar a contribuição de fragmentos moleculares.

A análise de alertas estruturais para sensibilização da pele demonstra que a predição de toxicidade não deve ser realizada apenas com alertas estruturais. Os alertas estruturais, contudo, quando validados estatisticamente por modelos de QSAR, podem ser utilizados para prover predições mais confiáveis e facilitar o planejamento de estruturas com propriedades desejadas.

Os resultados apresentados nessa tese representam um importante avanço no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais para sensibilização da pele. Além disso, é importante ressaltar que o Pred-Skin é um produto de inovação tecnológica, fato de extrema importância para o Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica. Espera-se que esse aplicativo seja bastante usado por

toxicologistas, agências regulatórias e pesquisadores que trabalham com o planejamento e desenvolvimento de fármacos.

Ao mesmo tempo, o artigo intitulado *Alarms about structural alerts* (ALVES et al., 2016b), elaborado como uma perspectiva, foi uma das primeiras vozes na literatura científica a alertar a comunidade científica sobre o uso inadequado de alertas estruturais para avaliação de toxicidade e definitivamente a primeira que propõe uma alternativa de como usar corretamente esses alertas. Esse artigo teve grande repercussão na mídia científica, sendo citado em vários canais de divulgação científica, como *R&D Magazine* (WALTER, 2016) e *Phys.org* (PHYS.ORG, 2016). Espera-se que esse alarme seja “ouvido em alto e bom som” por todos que fazem uso de métodos computacionais para avaliação de segurança de compostos químicos.

O trabalho desenvolvido não terminará com a defesa desta tese. Estamos preparando o conjunto de dados de compostos da REACH (<https://echa.europa.eu/regulations/reach>) que contém aproximadamente 10 mil registros de compostos com dados de sensibilização cutânea para desenvolver modelos mais robustos e mais preditivos. O Pred-Skin será continuamente atualizado quando dados adicionais forem encontrados. Por fim, uma pesquisa está em andamento sobre a presença de alertas estruturais em fármacos aprovados pelo FDA para reforçar a hipersensibilidade dos alertas.

Em suma, os resultados obtidos fornecem um forte argumento em favor do uso de modelos *in silico* como uma alternativa para ambos testes em animais e humanos para a sensibilização cutânea. Ressalta-se que são necessários esforços complementares para identificar dados adicionais de alta qualidade em seres humanos, tanto por uma busca na literatura mais persuasiva quanto pela realização de novos ensaios experimentais. A disponibilidade de dados adicionais permitirá desenvolver modelos de QSAR com maior poder de predição e confiabilidade.

- AALTO-KORTE, K.; ALANKO, K.; KUULIALA, O.; JOLANKI, R. Occupational methacrylate and acrylate allergy from glues. **Contact dermatitis**, v. 58, n. 6, p. 340–346, 2008.
- ADE, N.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; PALLARDY, M.; ROUSSET, F. Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. **Journal of immunotoxicology**, v. 3, p. 189–197, 2006.
- ADLER, S.; BASKETTER, D.; CRETON, S.; PELKONEN, O.; VAN BENTHEM, J.; ZUANG, V.; ANDERSEN, K. E.; ANGERS-LOUSTAU, A.; APTULA, A.; BAL-PRICE, A.; BENFENATI, E.; BERNAUER, U.; BESSEMS, J.; BOIS, F. Y.; BOOBIS, A.; BRANDON, E.; BREMER, S.; BROSCARD, T.; CASATI, S.; COECKE, S.; CORVI, R.; CRONIN, M.; DASTON, G.; DEKANT, W.; FELTER, S.; GRIGNARD, E.; GUNDERT-REMY, U.; HEINONEN, T.; KIMBER, I.; KLEINJANS, J.; KOMULAINEN, H.; KREILING, R.; KREYSA, J.; LEITE, S. B.; LOIZOU, G.; MAXWELL, G.; MAZZATORTA, P.; MUNN, S.; PFUHLER, S.; PHRAKONKHAM, P.; PIERSMA, A.; POTH, A.; PRIETO, P.; REPETTO, G.; ROGIERS, V.; SCHOETERS, G.; SCHWARZ, M.; SERAFIMOVA, R.; TÄHTI, H.; TESTAI, E.; VAN DELFT, J.; VAN LOVEREN, H.; VINKEN, M.; WORTH, A.; ZALDIVAR, J.-M. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 5, p. 367–485, 2011.
- AJMANI, S.; JADHAV, K.; KULKARNI, S. A. Three-Dimensional QSAR Using the k-Nearest Neighbor Method and Its Interpretation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 1, p. 24–31, 2006.
- ALLEN, T. E. H.; GOODMAN, J. M.; GUTSELL, S.; RUSSELL, P. J. Defining molecular initiating events in the adverse outcome pathway framework for risk assessment. **Chemical research in toxicology**, v. 27, n. 12, p. 2100–2112, 2014.
- ALVES, V. DE M. **Desenvolvimento de modelos de QSAR e análise quimiinformática da sensibilização e permeabilidade da pele**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2014.
- ALVES, V. M.; CAPUZZI, S. J.; MURATOV, E. N.; BRAGA, R. C.; THORNTON, T. E.; FOURCHES, D.; STRICKLAND, J.; KLEINSTREUER, N.; ANDRADE, C. H.; TROPSHA, A. QSAR models of human data can enrich or replace LLNA testing for human skin sensitization. **Green Chem.**, v. 18, n. 24, p. 6501–6515, 2016a.
- ALVES, V. M.; MURATOV, E. N.; CAPUZZI, S. J.; POLITI, R.; LOW, Y.; BRAGA, R. C.; ZAKHAROV, A. V.; SEDYKH, A.; MOKSHYNA, E.; FARAG, S.;

- ANDRADE, C. H.; KUZ'MIN, V. E.; FOURCHES, D.; TROPSHA, A. Alarms about structural alerts. **Green Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 4348–4360, 2016b.
- ALVES, V. M.; MURATOV, E. N.; FOURCHES, D.; STRICKLAND, J.; KLEINSTREUER, N.; ANDRADE, C. H.; TROPSHA, A. Predicting chemically-induced skin reactions. Part I: QSAR models of skin sensitization and their application to identify potentially hazardous compounds. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 284, n. 2, p. 262–272, 2015a.
- ALVES, V. M.; MURATOV, E. N.; FOURCHES, D.; STRICKLAND, J.; KLEINSTREUER, N.; ANDRADE, C. H.; TROPSHA, A. Predicting chemically-induced skin reactions. Part II: QSAR models of skin permeability and the relationships between skin permeability and skin sensitization. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 284, n. 2, p. 273–280, 2015b.
- ANDERSON, S. E.; SIEGEL, P. D.; MEADE, B. J. The LLNA: A Brief Review of Recent Advances and Limitations. **Journal of allergy**, v. 2011, p. 424203, 2011.
- ANVISA. RDC 35/2015. 2015.
- API, A. M.; BASKETTER, D.; LALKO, J. Correlation between experimental human and murine skin sensitization induction thresholds. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 34, n. 0, p. 1–5, 2014.
- ASHIKAGA, T.; YOSHIDA, Y.; HIROTA, M.; YONEYAMA, K.; ITAGAKI, H.; SAKAGUCHI, H.; MIYAZAWA, M.; ITO, Y.; SUZUKI, H.; TOYODA, H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 20, p. 767–773, 2006.
- ASTURIOL, D.; CASATI, S.; WORTH, A. Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 36, p. 197–209, 2016.
- AZIZ, T.; STEIN, J.; YOGESHWAR, R. Animal testing: TV or not TV? **Nature**, v. 470, p. 457–459, 2011.
- BAILEY, J.; THEW, M.; BALLS, M. An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v. 42, n. 3, p. 181–199, 2014.
- BAKER, N. C.; HEMMINGER, B. M. Mining connections between chemicals, proteins, and diseases extracted from Medline annotations. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 43, n. 4, p. 510–519, 2010.
- BASKETTER, D. A. The human repeated insult patch test in the 21st century: a commentary. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 28, n. 2, p. 49–53, 2009.

- BASKETTER, D. A.; ALÉPÉE, N.; ASHIKAGA, T.; BARROSO, J.; GILMOUR, N.; GOEBEL, C.; HIBATALLAH, J.; HOFFMANN, S.; KERN, P.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; MAXWELL, G.; REISINGER, K.; SAKAGUCHI, H.; SCHEPKY, A.; TAILHARDAT, M.; TEMPLIER, M. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. **Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug**, v. 25, n. 1, p. 11–21, 2014.
- BASKETTER, D. A.; BALIKIE, L.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I.; RYAN, C. A.; GERBERICK, G. F.; HARVEY, P.; EVANS, P.; WHITE, I. R.; RYCROFT, R. J. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. **Contact dermatitis**, v. 42, n. 6, p. 344–348, 2000.
- BASKETTER, D. A.; EVANS, P.; FIELDER, R. J.; GERBERICK, G. F.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 40, n. 5, p. 593–598, 2002.
- BASKETTER, D.; SAFFORD, B. Skin sensitization quantitative risk assessment: A review of underlying assumptions. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 105–116, 2016.
- BASKETTER, D.; WHITE, I.; MCFADDEN, J.; KIMBER, I. Skin sensitization: Implications for integration of clinical data into hazard identification and risk assessment. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1222–1230, 2015.
- BASKIN, I. I.; AIT, A. O.; HALBERSTAM, N. M.; PALYULIN, V. A.; ZEFIROV, N. S. An approach to the interpretation of backpropagation neural network models in QSAR studies. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 13, n. 1, p. 35–41, 2002.
- BHUSHAN, M.; CRAVEN, N. M.; BECK, M. H. Contact allergy to 2-aminoethanol (monoethanolamine) in a soluble oil. **Contact dermatitis**, v. 39, n. 6, p. 321, 1998.
- BIENFAIT, B.; ERTL, P. JSME: a free molecule editor in JavaScript. **Journal of cheminformatics**, v. 5, n. 5, p. 24, 2013.
- BISHOP, P. L.; MANUPPELLO, J. R.; WILLETT, C. E.; SANDLER, J. T. Animal Use and Lessons Learned in the U.S. High Production Volume Chemicals Challenge Program. **Environmental Health Perspectives**, v. C, n. 12, p. 1631–1639, 2012.
- BLAGG, J. Structural Alerts for Toxicity. In: **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 301–334.

- BORDEL-GÓMEZ, M. T.; MIRANDA-ROMERO, A. Sensitivity to diallyl disulfide in a Spanish population. **Contact dermatitis**, v. 59, n. 2, p. 125–126, 2008.
- BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2008.
- BRAGA, R. C.; ALVES, V. M.; MURATOV, E. N.; STRICKLAND, J.; KLEINSTREUER, N.; TROPSHA, A.; ANDRADE, C. H. Pred-Skin: A Fast and Reliable Web Application to Assess Skin Sensitization Effect of Chemicals. **Journal of chemical information and modeling**, v. 57, n. 5, p. 1013–1017, 2017.
- BRAGA, R. C.; ALVES, V. M.; SILVA, M. F. B.; MURATOV, E.; FOURCHES, D.; LIAO, L. M.; TROPSHA, A.; ANDRADE, C. H. Pred-HERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. **Molecular Informatics**, v. 34, n. 10, p. 698–701, 2015.
- BRAGA, R. C.; ALVES, V. M.; SILVA, M. F. B.; MURATOV, E.; FOURCHES, D.; TROPSHA, A.; ANDRADE, C. H. Tuning HERG out: antitarget QSAR models for drug development. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1399–1415, 2014.
- BREIMAN, L. E. O. Random Forests. **Machine Learning**, v. 45, p. 5–32, 2001.
- BREIMAN, L.; FRIEDMAN, J. H.; OLSHEN, R. A.; STONE, C. J. **Classification and Regression Trees**. Belmont: Wadsworth, 1984. v. 19
- BURDEN, N.; SEWELL, F.; CHAPMAN, K. Testing Chemical Safety: What Is Needed to Ensure the Widespread Application of Non-animal Approaches? **PLoS biology**, v. 13, n. 5, p. 1–8, 2015.
- BURTON, G. A.; CHAPMAN, P. M.; SMITH, E. P. Weight-of-Evidence Approaches for Assessing Ecosystem Impairment. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 8, n. 7, p. 1657–1673, 2002.
- CASATI, S.; ASCHBERGER, K.; ASTURIOL, D.; BASKETTER, D.; DIMITROV, S.; DUMONT, C.; KARLBERG, A.-T.; LEPOITTEVIN, J.-P.; PATLEWICZ, G.; ROBERTS, D. W.; WORTH, A. **Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting**.
- CHAUDHRY, Q.; PICLIN, N.; COTTERILL, J.; PINTORE, M.; PRICE, N. R.; CHRÉTIEN, J. R.; RONCAGLIONI, A. Global QSAR models of skin sensitizers for regulatory purposes. **Chemistry Central journal**, v. 4 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S5, 2010.
- CHERKASOV, A.; MURATOV, E. N.; FOURCHES, D.; VARNEK, A.; BASKIN, I. I.; CRONIN, M.; DEARDEN, J.; GRAMATICA, P.; MARTIN, Y. C.; TODESCHINI,

- R.; CONSONNI, V.; KUZ'MIN, V. E.; CRAMER, R.; BENIGNI, R.; YANG, C.; RATHMAN, J.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J.; RICHARD, A.; TROPSHA, A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977–5010, 2014.
- CHUPRINA, A.; LUKIN, O.; DEMOISEAUX, R.; BUZKO, A.; SHIVANYUK, A. Drug- and lead-likeness, target class, and molecular diversity analysis of 7.9 million commercially available organic compounds provided by 29 suppliers. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 4, p. 470–479, 2010.
- COCKSHOTT, A.; EVANS, P.; RYAN, C. A.; GERBERICK, G. F.; BETTS, C. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I.; BASKETTER, D. A. The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective. **Human & experimental toxicology**, v. 25, n. 7, p. 387–394, 2006.
- COLLINS, T. The importance of sustainability ethics, toxicity and ecotoxicity in chemical education and research. **Green Chemistry**, v. 5, n. 4, p. G51–G52, 2003.
- CONCEA. **Resolução Normativa CONCEA Nº 31 DE 18/08/2016**. [s.l.: s.n.].
- CRAMER, R. D. The inevitable QSAR renaissance. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, n. 1, p. 35–38, 2012.
- CRONIN, M. T. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) -- applications and methodology. In: PUZYN, T.; LESZCZYNSKI, J.; CRONIN, M. T. (Eds.). . **Recent Advances in QSAR Studies**. Dordrecht: Springer, 2010. p. 3–11.
- CRONIN, M. T. D. An Introduction to Chemical Grouping, Categories and Read-Across to Predict Toxicity. In: **Chemical Toxicity Prediction: Category Formation and Read-Across**. [s.l.: s.n.]. p. 1–29.
- CRONIN, M. T. D. Evaluation of Categories and Read-Across for Toxicity Prediction Allowing for Regulatory Acceptance. In: CRONIN, M.; MADDEN, J.; ENOCH, S.; ROBERTS, D. (Eds.). . **Chemical Toxicity Prediction: Category Formation and Read-Across**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2013b. p. 155–167.
- DAVIS, M.; BOEKELHEIDE, K.; BOVERHOF, D. R.; EICHENBAUM, G.; HARTUNG, T.; HOLSAPPLE, M. P.; JONES, T. W.; RICHARD, A. M.; WATKINS, P. B. The new revolution in toxicology: The good, the bad, and the ugly. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1278, n. 1, p. 11–24, 2013.
- DEARDEN, J. C.; HEWITT, M.; ROBERTS, D. W.; ENOCH, S. J.; ROWE, P. H.; PRZYBYLAK, K. R.; VAUGHAN-WILLIAMS, G. D.; SMITH, M. L.; PILLAI, G. G.; KATRITZKY, A. R. Mechanism-Based QSAR Modeling of Skin Sensitization. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 1975–1986, 2015.

- DIX, D. J.; HOUCK, K. A.; MARTIN, M. T.; RICHARD, A. M.; SETZER, R. W.; KAVLOCK, R. J. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 95, n. 1, p. 5–12, 2007.
- DOMINGOS, P. A few useful things to know about machine learning. **Communications of the ACM**, v. 55, n. 10, p. 78, 2012.
- DOWNS, G. M.; BARNARD, J. M. Clustering Methods and Their Uses in Computational Chemistry. In: LIPKOWITZ, K. B.; BOYD, D. B. (Eds.). . **Reviews in Computational Chemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2003. v. 18p. 1–40.
- DUMONT, C.; BARROSO, J.; MATYS, I.; WORTH, A.; CASATI, S. Analysis of the local lymph node assay (LLNA) variability for assessing the prediction of skin sensitisation potential and potency of chemicals with non-animal approaches. **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 220–228, 2016.
- ECHA. **Agrupamento de substâncias e métodos comparativos por interpolação**. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/pt/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/grouping-of-substances-and-read-across>>. Acesso em: 8 out. 2016.
- ECHA. **Guidance in a nutshell - Chemical Safety Assessment**. Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/nutshell_guidance_csa_en.pdf>. Acesso em: 25 out. 2016.
- ECHA. **The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation: Second Report under Article 117(3) of the REACH Regulation**. Disponível em: <http://echa.europa.eu/documents/10162/13639/alternatives_test_animals_2014_en.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2016.
- EGEGHY, P. P.; JUDSON, R.; GANGWAL, S.; MOSHER, S.; SMITH, D.; VAIL, J.; HUBAL, E. A. C. The exposure data landscape for manufactured chemicals. **The Science of the total environment**, v. 414, p. 159–166, 2012.
- EKINS, S. Progress in computational toxicology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 2, p. 115–140, 2014.
- ELOKELY, K. M.; DOERKSEN, R. J. Docking challenge: protein sampling and molecular docking performance. **Journal of chemical information and modeling**, v. 53, n. 8, p. 1934–1945, 2013.
- ENOCH, S. J.; CRONIN, M. T. D.; SCHULTZ, T. W.; MADDEN, J. C. Quantitative and mechanistic read across for predicting the skin sensitization potential of alkenes acting via Michael addition. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 2, p. 513–520, 2008.

- ENOCH, S. J.; ROBERTS, D. W. Approaches for Grouping Chemicals into Categories. In: CRONIN, M.; MADDEN, J.; ENOCH, S.; ROBERTS, D. (Eds.). **Chemical Toxicity Prediction: Category Formation and Read-Across**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2013. p. 30–43.
- EPA. **Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.2600 Skin Sensitization**. Disponível em: <<https://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPPT-2009-0156-0008>>. Acesso em: 9 jun. 2016.
- ESTRADA, E.; PATLEWICZ, G.; CHAMBERLAIN, M.; BASKETTER, D.; LARBAY, S. Computer-aided knowledge generation for understanding skin sensitization mechanisms: the TOPS-MODE approach. **Chemical research in toxicology**, v. 16, n. 10, p. 1226–1235, 2003.
- EURL ECVAM. **Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)**. Disponível em: <<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>>. Acesso em: 29 jan. 2015.
- EURL ECVAM. **Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing**. Disponível em: <<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation>>. Acesso em: 29 jan. 2015.
- EUROPEAN COMMISSION. **On the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/com_at_2013_en.pdf>. Acesso em: 9 fev. 2016.
- EUROPEAN UNION. **Directive 2003/15/EC Official Journal of the European Union**, 2003.
- EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 1907/2006. **Official Journal of the European Union**, n. L 136, p. 3–280, 2007.
- EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 1223/2009. **Official Journal of the European Union**, n. L 342, p. 59–209, 2009.
- FEDOROWICZ, A.; SINGH, H.; SODERHOLM, S.; DEMCHUK, E. Structure-activity models for contact sensitization. **Chemical research in toxicology**, v. 18, n. 6, p. 954–969, 2005.
- FEDOROWICZ, A.; ZHENG, L.; SINGH, H.; DEMCHUK, E. QSAR study of skin sensitization using local lymph node assay data. **International journal of molecular sciences**, v. 5, n. 2, p. 56–66, 2004.

- FILIMONOV, D. A.; ZAKHAROV, A. V.; LAGUNIN, A. A.; POROIKOV, V. V. QNA-based "Star Track" QSAR approach. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 20, n. 7–8, p. 679–709, 2009.
- FOURCHES, D. Cheminformatics: At the Crossroad of Eras. In: GORB, L.; KUZ'MIN, V.; MURATOV, E. (Eds.). . **Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 539–546.
- FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2010.
- FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Curation of chemogenomics data. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 8, p. 535–535, 2015.
- FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation. **Journal of chemical information and modeling**, v. 56, n. 7, p. 1243–1252, 2016.
- FRYE, S. V.; ARKIN, M. R.; ARROWSMITH, C. H.; CONN, P. J.; GLICKSMAN, M. A.; HULL-RYDE, E. A.; SLUSHER, B. S. Tackling reproducibility in academic preclinical drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 733–734, 2015.
- FYHRQUIST, N.; LEHTO, E.; LAUERMA, A. New findings in allergic contact dermatitis. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 14, n. 5, p. 430–435, 2014.
- GADALETA, D.; MANGIATORDI, G. F.; CATTO, M.; CAROTTI, A.; NICOLOTTI, O. Applicability Domain for QSAR Models: Where Theory Meets Reality. **International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships**, v. 1, n. 1, p. 45–63, 2016.
- GALLO, R.; BASSO, M.; VOLTOLINI, S.; GUARRERA, M. Allergic contact dermatitis from laureth-9 and polyquaternium-7 in a skin-care product. **Contact dermatitis**, v. 45, n. 6, p. 356–357, 2001.
- GERBERICK, G. F.; ROBINSON, M. K.; RYAN, C. A.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I.; BASKETTER, D. A.; WRIGHT, Z.; MARKS, J. G. Contact allergenic potency: correlation of human and local lymph node assay data. **American journal of contact dermatitis : official journal of the American Contact Dermatitis Society**, v. 12, n. 3, p. 156–161, 2001.
- GERBERICK, G. F.; VASSALLO, J. D.; BAILEY, R. E.; CHANEY, J. G.; MORRALL, S. W.; LEPOITTEVIN, J.-P. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 81, n. 2, p. 332–343, 2004.

- GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 20, n. 4, p. 269–276, 2002.
- GOLLA, S.; MADIHALLY, S.; ROBINSON, R. L.; GASEM, K. A. M. Quantitative structure-property relationship modeling of skin sensitization: a quantitative prediction. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 23, n. 3, p. 454–465, 2009.
- GRAMATICA, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 26, n. 5, p. 694–701, 2007.
- GRAMATICA, P.; CASSANI, S.; SANGION, A. Aquatic ecotoxicity of personal care products: QSAR models and ranking for prioritization and safer alternatives' design. **Green Chem.**, v. 18, n. 16, p. 4393–4406, 2016.
- GREEK, R.; MENACHE, A. Systematic Reviews of Animal Models: Methodology versus Epistemology. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 206–221, 2013.
- GRIEM, P.; GOEBEL, C.; SCHEFFLER, H. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 38, n. 3, p. 269–290, 2003.
- GRIFFITH, J. F. Predictive and diagnostic testing for contact sensitization. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 14, p. 90–102, 1969.
- GUNTURI, S. B.; THEERTHALA, S. S.; PATEL, N. K.; BAHL, J.; NARAYANAN, R. Prediction of skin sensitization potential using D-optimal design and GA-kNN classification methods. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 21, n. 3–4, p. 305–335, 2010.
- HANSCH, C.; MALONEY, P. P.; FUJITA, T.; MUIR, R. M. Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. **Nature**, v. 194, n. 4824, p. 178–180, 1962.
- HARTUNG, T. Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work. **ALTEX**, v. 30, n. 3, p. 275–291, 2013.
- HARTUNG, T. Making big sense from big data in toxicology by read-across. **ALTEX**, v. 33, n. 2, p. 83–93, 2016.
- HARTUNG, T.; DASTON, G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? **Toxicological Sciences**, v. 111, n. 2, p. 233–237, 2009.
- HELGEE, E. A.; CARLSSON, L.; BOYER, S.; NORINDER, U. Evaluation of quantitative structure-activity relationship modeling strategies: local and global models. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 4, p. 677–689, 2010.

- HENNINO, A.; VOCANSON, M.; CHAVAGNAC, C.; SAINT-MEZARD, P.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. Update on the pathophysiology with special emphasis on CD8 effector T cells and CD4 regulatory T cells. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 335–347, 2005.
- HEWITT, M.; ENOCH, S. J.; MADDEN, J. C.; PRZYBYLAK, K. R.; CRONIN, M. T. D. Hepatotoxicity: a scheme for generating chemical categories for read-across, structural alerts and insights into mechanism(s) of action. **Critical reviews in toxicology**, v. 43, n. 7, p. 537–558, 2013.
- HOFFMANN, S. LLNA variability: An essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin sensitization test methods and strategies. **ALTEX**, v. 32, n. 4, p. 379–383, 2015.
- ICCVAM. **The reduced murine local lymph node assay: an alternative test method using fewer animals to assess the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products**. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/LLNA-LD/TMER.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- ICCVAM. **Usefulness and limitations of the murine local lymph node assay for potency categorization of chemicals causing allergic contact dermatitis in humans**. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/immunotoxicity/llna-potency/tmer/index.html>>. Acesso em: 9 fev. 2015.
- ICCVAM. **Evaluations of non-animal skin sensitization test methods and testing strategies**. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/go/40500>>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- ICCVAM; NICEATM. **The murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds**. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- JĘDRZEJEWSKA, S. Animal testing--science or tradition? What future for alternatives to animal testing? **ALTEX**, v. 31, n. 3, p. 371–374, 2014.
- KARLBERG, A.-T.; BERGSTRÖM, M. A.; BÖRJE, A.; LUTHMAN, K.; NILSSON, J. L. G. Allergic contact dermatitis - formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 1, p. 53–69, 2008.
- KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137, 1969.
- KIMBER, I.; BASKETTER, D. A.; BERTHOLD, K.; BUTLER, M.; GARRIGUE, J. L.; LEA, L.; NEWSOME, C.; ROGGE BAND, R.; STEILING, W.; STROPP, G.;

- WATERMAN, S.; WIEMANN, C. Skin sensitization testing in potency and risk assessment. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 59, n. 2, p. 198–208, 2001.
- KLIGMAN, A. M. The identification of contact allergens by human assay. I. A critique of standard methods. **The Journal of investigative dermatology**, v. 47, p. 369–374, 1966a.
- KLIGMAN, A. M. The identification of contact allergens by human assay. 3. The maximization test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. **The Journal of investigative dermatology**, v. 47, n. 5, p. 393–409, 1966b.
- KLIGMAN, A. M.; EPSTEIN, W. Updating the maximization test for identifying contact allergens. **Contact dermatitis**, v. 1, n. 4, p. 231–239, 1975.
- KOSTAL, J.; VOUTCHKOVA-KOSTAL, A. CADRE-SS, an in Silico Tool for Predicting Skin Sensitization Potential Based on Modeling of Molecular Interactions. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 58–64, 2016.
- KUZ'MIN, V. E.; ARTEMENKO, A. G.; MURATOV, E. N. Hierarchical QSAR technology based on the Simplex representation of molecular structure. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 22, n. 6–7, p. 403–421, 2008.
- KUZ'MIN, V. E.; MURATOV, E. N.; ARTEMENKO, A. G.; VARLAMOVA, E. V.; GORB, L.; WANG, J.; LESZCZYNSKI, J. Consensus QSAR modeling of phosphor-containing chiral AChE inhibitors. **QSAR & combinatorial science**, v. 28, n. 6–7, p. 664–677, 2009.
- KUZ'MIN, V. E.; POLISHCHUK, P. G.; ARTEMENKO, A. G.; ANDRONATI, S. A. Interpretation of QSAR Models Based on Random Forest Methods. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 6–7, p. 593–603, 2011.
- LAGUNIN, A.; FILIMONOV, D.; ZAKHAROV, A.; XIE, W.; HUANG, Y.; ZHU, F.; SHEN, T.; YAO, J.; POROIKOV, V. Computer-Aided Prediction of Rodent Carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 8, p. 806–810, 2009.
- LAGUNIN, A.; ZAKHAROV, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 2–3, p. 241–250, 2011.
- LANGLEY, G.; AUSTIN, C. P.; BALAPURE, A. K.; BIRNBAUM, L. S.; BUCHER, J. R.; FENTEM, J.; FITZPATRICK, S. C.; FOWLE, J. R.; KAVLOCK, R. J.; KITANO, H.; LIDBURY, B. A.; MUOTRI, A. R.; PENG, S.-Q.; SAKHAROV, D.; SEIDLE, T.; TREZ, T.; TONEVITSKY, A.; VAN DE STOLPE, A.; WHELAN, M.; WILLETT, C. Lessons from Toxicology: Developing a 21st-Century Paradigm for Medical Research. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 11, p. 268–272, 2015.

- LEINO, T.; ESTLANDER, T.; KANERVA, L. Occupational allergic dermatoses in hairdressers. **Contact dermatitis**, v. 38, n. 3, p. 166–167, 1998.
- LI, L.-F.; SUJAN, S. A.; LI, Q. X. Contact urticaria syndrome from occupational benzonitrile exposure. **Contact dermatitis**, v. 50, n. 6, p. 377–378, 2004.
- LI, S.; FEDOROWICZ, A.; SINGH, H.; SODERHOLM, S. C. Application of the random forest method in studies of local lymph node assay based skin sensitization data. **Journal of chemical information and modeling**, v. 45, n. 4, p. 952–964, 2005.
- LI, Y.; TSENG, Y. J.; PAN, D.; LIU, J.; KERN, P. S.; GERBERICK, G. F.; HOPFINGER, A. J. 4D-fingerprint categorical QSAR models for skin sensitization based on the classification of local lymph node assay measures. **Chemical research in toxicology**, v. 20, n. 1, p. 114–128, 2007.
- LIU, R.; YU, X.; WALLQVIST, A. Data-driven identification of structural alerts for mitigating the risk of drug-induced human liver injuries. **Journal of Cheminformatics**, v. 7, n. 1, p. 4, 2015.
- LOMBARDO, A.; RONCAGLIONI, A.; BENFENTATI, E.; NENDZA, M.; SEGNER, H.; FERNANDEZ, A.; KHNE, R.; FRANCO, A.; PAUN, E.; SCHIRMANN, G. Integrated testing strategy (ITS) for bioaccumulation assessment under REACH. **Environment International**, v. 69, p. 40–50, 2014.
- LOW, Y. S.; CASTER, O.; BERGVALL, T.; FOURCHES, D.; ZANG, X.; NORÉN, G. N.; RUSYN, I.; EDWARDS, R.; TROPSHA, A. Cheminformatics-aided pharmacovigilance: application to Stevens-Johnson Syndrome. **Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA**, n. January 2016, p. ocv127, 2015.
- LOW, Y.; SEDYKH, A.; FOURCHES, D.; GOLBRAIKH, A.; WHELAN, M.; RUSYN, I.; TROPSHA, A. Integrative chemical-biological read-across approach for chemical hazard classification. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 8, p. 1199–1208, 2013.
- LU, J.; ZHENG, M.; WANG, Y.; SHEN, Q.; LUO, X.; JIANG, H.; CHEN, K. Fragment-based prediction of skin sensitization using recursive partitioning. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 25, n. 9, p. 885–893, 2011.
- LUSHINGTON, G. H. Computational toxicology: screening, chemistry, or much more? **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 17, n. 9, p. 733, 2014.
- MACAN, J.; RIMAC, D.; KEŽIĆ, S.; VARNAI, V. M. Occupational and non-occupational allergic contact dermatitis: a follow-up study. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 227, n. 4, p. 321–329, 2013.

- MACKAY, C.; DAVIES, M.; SUMMERFIELD, V.; MAXWELL, G. From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. **Altex**, v. 30, n. 4, p. 473–486, 2013.
- MAERTENS, A.; ANASTAS, N.; SPENCER, P. J.; STEPHENS, M.; GOLDBERG, A.; HARTUNG, T. Green toxicology. **ALTEX**, v. 31, n. 3, p. 243–249, 2014.
- MAGGIORA, G. M. The reductionist paradox: are the laws of chemistry and physics sufficient for the discovery of new drugs? **Journal of computer-aided molecular design**, v. 25, n. 8, p. 699–708, 2011.
- MAGNUSSON, B.; KLIGMAN, A. M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. **The Journal of investigative dermatology**, v. 52, n. 3, p. 268–276, 1969.
- MALLON, J.; CHU, M. T.; MAIBACH, H. I. Occupational allergic contact dermatitis from methyl chloroform (1,1,1-trichloroethane)? **Contact dermatitis**, v. 45, n. 2, p. 107, 2001.
- MANGIPUDY, R.; BURKHARDT, J.; KADAMBI, V. J. Use of animals for toxicology testing is necessary to ensure patient safety in pharmaceutical development. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 70, n. 2, p. 439–441, 2014.
- MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. Contact allergy: predictive testing in man. **Contact dermatitis**, v. 2, p. 1–17, 1976.
- MATHEA, M.; KLINGSPOHN, W.; BAUMANN, K. Chemoinformatic Classification Methods and their Applicability Domain. **Molecular Informatics**, v. 35, n. 5, p. 160–180, 2016.
- MATURA, M.; SKÖLD, M.; BÖRJE, A.; ANDERSEN, K. E.; BRUZE, M.; FROSCHE, P.; GOOSSENS, A.; JOHANSEN, J. D.; SVEDMAN, C.; WHITE, I. R.; KARLBERG, A.-T. Selected oxidized fragrance terpenes are common contact allergens. **Contact dermatitis**, v. 52, n. 6, p. 320–328, 2005.
- MAZANETZ, M. P.; MARMON, R. J.; REISSER, C. B. T.; MORAO, I. Drug discovery applications for KNIME: an open source data mining platform. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 18, p. 1965–1979, 2012.
- MCTI. **Parecer nº 838 - Representações contra dispositivo da Resolução Normativa 17/14Ciência e Tecnologia**. [s.l.: s.n.].
- MELNIKOV, F.; KOSTAL, J.; VOUTCHKOVA-KOSTAL, A.; ZIMMERMAN, J. B.; T. ANASTAS, P. Assessment of predictive models for estimating the acute aquatic toxicity of organic chemicals. **Green Chem.**, v. 18, n. 16, p. 4432–4445, 2016.

- MELVILLE, J. L.; BURKE, E. K.; HIRST, J. D. Machine learning in virtual screening. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 12, n. 4, p. 332–343, 2009.
- MERCIER, D. **Clustering large datasets**. Disponível em: <<http://ldc.usb.ve/~mcuriel/Cursos/WC/Transfer.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- MILLER, M. D.; YOURTEE, D. M.; GLAROS, A. G.; CHAPPELOW, C. C.; EICK, J. D.; HOLDER, A. J. Quantum mechanical structure-activity relationship analyses for skin sensitization. **Journal of chemical information and modeling**, v. 45, n. 4, p. 924–929, 2005.
- MOHAN, C. G. Impact of computational structure-based predictive toxicology in drug discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 14, n. 5, p. 417–426, 2011.
- MUIR, D. C. G.; HOWARD, P. H. Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 23, p. 7157–7166, 2006.
- NANDY, A.; KAR, S.; ROY, K. Linear discriminant analysis for skin sensitisation potential of diverse organic chemicals. **Molecular Simulation**, v. 39, n. 6, p. 432–441, 2013a.
- NANDY, A.; KAR, S.; ROY, K. Development and validation of regression-based QSAR models for quantification of contributions of molecular fragments to skin sensitization potency of diverse organic chemicals. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 24, n. 12, p. 1009–1023, 2013b.
- NANDY, A.; KAR, S.; ROY, K. Development of classification- and regression-based QSAR models and in silico screening of skin sensitisation potential of diverse organic chemicals. **Molecular Simulation**, v. 40, n. 4, p. 261–274, 2014.
- NAVEN, R.; LOUISE-MAY, S. Computational toxicology: Its essential role in reducing drug attrition. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1304–1309, 2015.
- OECD. **Grouping of Chemicals: Chemical Categories and Read-Across**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/groupingofchemicalschemicalcategoriesandread-across.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- OECD. **Test No. 406: Skin Sensitisation**. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en>. Acesso em: 16 mar. 2017.
- OECD. **Report of the workshop on structural alerts for the OECD (Q)SAR application toolbox**. Disponível em:

<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)4&doclanguage=en)>. Acesso em: 23 jun. 2016a.

OECD. **Guidance document for using the OECD (Q)SAR application Toolbox to develop chemical categories according to the OECD guidance on grouping of chemicals.** Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2009\)5](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2009)5)>. Acesso em: 10 fev. 2016b.

OECD. **Test No. 429: Skin Sensitisation.** Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en>. Acesso em: 16 mar. 2017a.

OECD. **Test No. 442A: Skin Sensitization.** Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en>. Acesso em: 16 mar. 2017b.

OECD. **Test No. 442B: Skin Sensitization.** Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en>. Acesso em: 16 mar. 2017c.

OECD. **The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins.** Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/the-adverse-outcome-pathway-for-skin-sensitisation-initiated-by-covalent-binding-to-proteins_9789264221444-en>. Acesso em: 8 fev. 2016.

OECD. **QSAR Toolbox v. 3.2.** Disponível em: <<http://www.qsartoolbox.org/>>. Acesso em: 6 out. 2014.

OECD. **TG 442C In chemico skin sensitisation: direct peptide reactivity assay (DPRA).** [s.l.: s.n.].

OECD. **Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase test method.** [s.l.] OECD Publishing, 2015b.

OECD. **QSAR Toolbox v. 3.3.** Disponível em: <<http://www.qsartoolbox.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

ÖZGÜR, A.; ÖZGÜR, L.; GÜNGÖR, T. Text Categorization with Class-Based and Corpus-Based Keyword Selection. In: YOLUM, P.; GÜNGÖR, T.; GÜRGEN, F.; ÖZTURAN, C. (Eds.). **Lecture Notes in Computer Science (LNCS).** Lecture Notes in Computer Science. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. v. 3733p. 606–615.

PATLEWICZ, G.; KUSEVA, C.; KESOVA, A.; POPOVA, I.; ZHECHEV, T.; PAVLOV, T.; ROBERTS, D. W.; MEKENYAN, O. Towards AOP application - Implementation of an integrated approach to testing and assessment (IATA)

into a pipeline tool for skin sensitization. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 529–545, 2014.

PERALE, L.; DE MARCHI, S.; CECCHIN, E.; SECHI, L. A. Methacrylates allergy in a professional beautician. **Contact dermatitis**, v. 53, n. 3, p. 181–182, 2005.

PHYS.ORG. **Scientists devise more accurate system for predicting risks of new chemical products**. Disponível em: <<https://phys.org/news/2016-11-scientists-accurate-chemical-products.html>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

PIROIRD, C.; OVIGNE, J.-M.; ROUSSET, F.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; GOMES, C.; COTOVIO, J.; ALÉPÉE, N. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 29, n. 5, p. 901–916, 2015.

PIZZO, F.; GADALETA, D.; LOMBARDO, A.; NICOLOTTI, O.; BENFENATI, E. Identification of structural alerts for liver and kidney toxicity using repeated dose toxicity data. **Chemistry Central Journal**, v. 9, n. 1, p. 62, 2015.

PLENGE, R. M.; SCOLNICK, E. M.; ALTSHULER, D. Validating therapeutic targets through human genetics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 8, p. 581–594, 2013.

POLISHCHUK, P.; KUZ'MIN, V.; ARTEMENKO, A.; MURATOV, E. Universal approach for structural interpretation of QSAR/QSPR models. **Molecular Informatics**, v. 32, p. 843–853, 2013.

POLITANO, V. T.; API, A. M. The Research Institute for Fragrance Materials' human repeated insult patch test protocol. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 35–38, 2008.

RAMIREZ, T.; MEHLING, A.; KOLLE, S. N.; WRUCK, C. J.; TEUBNER, W.; ELTZE, T.; AUMANN, A.; URBISCH, D.; RAVENZWAAY, B. VAN; LANDSIEDEL, R. LuSens: A keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 8, p. 1482–1497, 2014.

RAUNIO, H. In silico toxicology - non-testing methods. **Frontiers in pharmacology**, v. 2, n. June, p. 33, 2011.

RIDINGS, J. E.; BARRATT, M. D.; CARY, R.; EARNSHAW, C. G.; EGGINGTON, C. E.; ELLIS, M. K.; JUDSON, P. N.; LANGOWSKI, J. J.; MARCHANT, C. A.; PAYNE, M. P.; WATSON, W. P.; YIH, T. D. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: an update on the DEREK system. **Toxicology**, v. 106, n. 1–3, p. 267–279, 1996.

- RINIKER, S.; LANDRUM, G. A. Similarity maps - A visualization strategy for molecular fingerprints and machine-learning methods. **Journal of Cheminformatics**, v. 5, n. 9, p. 43, 2013.
- ROBERTS, D. W. Estimating skin sensitization potency from a single dose LLNA. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 71, n. 3, p. 437–443, 2015.
- ROBERTS, D. W.; APTULA, A. O.; PATLEWICZ, G. Mechanistic applicability domains for non-animal based prediction of toxicological endpoints. QSAR analysis of the schiff base applicability domain for skin sensitization. **Chemical research in toxicology**, v. 19, n. 9, p. 1228–1233, 2006.
- ROBERTS, D. W.; PATLEWICZ, G.; DIMITROV, S. D.; LOW, L. K.; APTULA, A. O.; KERN, P. S.; DIMITROVA, G. D.; COMBER, M. I. H.; PHILLIPS, R. D.; NIEMELÄ, J.; MADSEN, C.; WEDEBYE, E. B.; BAILEY, P. T.; MEKENYAN, O. G. TIMES-SS--a mechanistic evaluation of an external validation study using reaction chemistry principles. **Chemical research in toxicology**, v. 20, n. 9, p. 1321–1330, 2007a.
- ROBERTS, D. W.; PATLEWICZ, G.; KERN, P. S.; GERBERICK, F.; KIMBER, I.; DEARMAN, R. J.; RYAN, C. A.; BASKETTER, D. A.; APTULA, A. O. Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 7, p. 1019–1030, 2007b.
- ROGERS, D.; HAHN, M. Extended-connectivity fingerprints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 5, p. 742–754, 2010.
- ROVIDA, C.; ALÉPÉE, N.; API, A. M.; BASKETTER, D. A.; BOIS, F. Y.; CALONI, F.; CORSINI, E.; DANESHIAN, M.; ESKES, C.; EZENDAM, J.; FUCHS, H.; HAYDEN, P.; HEGELE-HARTUNG, C.; HOFFMANN, S.; HUBESCH, B.; JACOBS, M. N.; JAWORSKA, J.; KLEENSANG, A.; KLEINSTREUER, N.; LALKO, J.; LANDSIEDEL, R.; LEBREUX, F.; LUECHTEFELD, T.; LOCATELLI, M.; MEHLING, A.; NATSCH, A.; PITCHFORD, J. W.; PRATER, D.; PRIETO, P.; SCHEPKY, A.; SCHÜÜRMAN, G.; SMIRNOVA, L.; TOOLE, C.; VAN VLIET, E.; WEISENSEE, D.; HARTUNG, T. Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment. **ALTEX**, v. 32, n. 1, p. 25–40, 2015.
- RYAN, C. A.; GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; BASKETTER, D. A.; LEA, L.; BLAIKIE, L.; DEARMAN, R. J.; WARBRICK, E. V.; KIMBER, I. Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay. **Contact dermatitis**, v. 43, n. 2, p. 95–102, 2000.
- SCHNEIDER, K.; AKKAN, Z. Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 39, n. 3, p. 245–255, 2004.
- SCHOLLES, E. W.; BASKETTER, D. A.; SARLL, A. E.; KIMBER, I.; EVANS, C. D.; MILLER, K.; ROBBINS, M. C.; HARRISON, P. T.; WAITE, S. J. The local

lymph node assay: results of a final inter-laboratory validation under field conditions. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 12, n. 3, p. 217–222, 1992.

SCHOMBURG, K. T.; RAREY, M. Benchmark data sets for structure-based computational target prediction. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 8, p. 2261–2274, 2014.

SCHULTE, P. A.; MCKERNAN, L. T.; HEIDEL, D. S.; OKUN, A. H.; DOTSON, G. S.; LENTZ, T. J.; GERACI, C. L.; HECKEL, P. E.; BRANCHE, C. M. Occupational safety and health, green chemistry, and sustainability: a review of areas of convergence. **Environmental Health**, v. 12, n. 1, p. 31, 2013.

SCHWARTZ, L.; PECK, S. M. The patch test in contact dermatitis. **Journal of the National Association of Chiropodists**, v. 36, p. 7–16, 1946.

SHANMUGAM, S.; WILKINSON, M. Allergic contact dermatitis caused by a cyanoacrylate-containing false eyelash glue. **Contact dermatitis**, v. 67, n. 5, p. 309–310, 2012.

SHERIDAN, R. P. Global quantitative structure-activity relationship models vs selected local models as predictors of off-target activities for project compounds. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 4, p. 1083–1092, 2014.

SJÖBORG, S.; FREGERT, S.; TRULSSON, L. Contact allergy to styrene and related chemicals. **Contact dermatitis**, v. 10, n. 2, p. 94–96, 1984.

SKUDLIK, C.; MEYER, E.; ALLMERS, H.; DOMAGALSKI, E.; JOHN, S. M. [Endemic air-borne contact dermatitis? Frequent occurrence of a rare contact allergy in a waste collection facility]. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 62, n. 10, p. 765–769, 2011.

STANTON, D. T. QSAR and QSPR model interpretation using partial least squares (PLS) analysis. **Current computer-aided drug design**, v. 8, n. 2, p. 107–127, 2012.

STEPAN, A. F.; WALKER, D. P.; BAUMAN, J.; PRICE, D. A.; BAILLIE, T. A.; KALGUTKAR, A. S.; ALEO, M. D. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. **Chemical research in toxicology**, v. 24, n. 9, p. 1345–1410, 2011.

STRAZZULA, L.; DAS, S.; NAMBU DIRI, V. E.; KROSHINSKY, D. Fingertip purpura in a dental student: an unusual manifestation of methyl methacrylate dermatitis. **JAMA dermatology**, v. 150, n. 7, p. 784–785, 2014.

- STRICKLAND, J.; ZANG, Q.; KLEINSTREUER, N.; PARIS, M.; LEHMANN, D. M.; CHOKSI, N.; MATHESON, J.; JACOBS, A.; LOWIT, A.; ALLEN, D.; CASEY, W. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 36, n. 9, p. 1150–1162, 2016.
- SUSHKO, I.; SALMINA, E.; POTEKIN, V. A.; PODA, G.; TETKO, I. V. ToxAlerts: a Web server of structural alerts for toxic chemicals and compounds with potential adverse reactions. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 8, p. 2310–2316, 2012.
- SVENSSON, C. K. Biotransformation of Drugs in Human Skin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 2, p. 247–253, 2009.
- TALETE SRL. **Dragon for Windows (Software for Molecular Descriptor Calculations)** Milan Talete SRL, , 2007. Disponível em: <<http://www.talete.mi.it/>>
- TARAN, J. M.; DELANEY, T. A. Contact allergy to chloroacetamide. **The Australasian journal of dermatology**, v. 38, n. 2, p. 95–96, 1997.
- THYSSEN, J. P.; ENKILDE, K.; LUNDOV, M. D.; CARLSEN, B. C.; MENNÉ, T.; JOHANSEN, J. D. Temporal trends of preservative allergy in Denmark (1985-2008). **Contact dermatitis**, v. 62, n. 2, p. 102–108, 2010.
- TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Molecular Descriptors for Chemoinformatics**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2009. v. 41
- TOHOLKA, R.; NIXON, R. Allergic contact dermatitis to chlorhexidine. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 54, n. 4, p. 303–306, 2013.
- TOMB, R. R.; LEPOITTEVIN, J. P.; DUREPAIRE, F.; GROSSHANS, E. Ectopic contact dermatitis from ethyl cyanoacrylate instant adhesives. **Contact dermatitis**, v. 28, n. 4, p. 206–208, 1993.
- TOXTREE. **Skin sensitisation reactivity domains**. Disponível em: <<http://toxtree.sourceforge.net/skinsensitisation.html>>. Acesso em: 2 ago. 2016.
- TROPSHA, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. **Molecular informatics**, v. 29, n. 6–7, p. 476–488, 2010.
- TROPSHA, A.; GRAMATICA, P.; GOMBAR, V. K. The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. **QSAR & combinatorial science**, v. 22, n. 1, p. 69–77, 2003.
- UNITED NATIONS. Respiratory or skin sensitization. In: **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. 6. ed. [s.l.] UNECE, 2015. p. 149–157.

- URBISCH, D.; MEHLING, A.; GUTH, K.; RAMIREZ, T.; HONARVAR, N.; KOLLE, S.; LANDSIEDEL, R.; JAWORSKA, J.; KERN, P. S.; GERBERICK, F.; NATSCH, A.; EMTER, R.; ASHIKAGA, T.; MIYAZAWA, M.; SAKAGUCHI, H. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 71, n. December, p. 337–351, 2014.
- VAN DER VEEN, J. W.; RORIJE, E.; EMTER, R.; NATSCH, A.; VAN LOVEREN, H.; EZENDAM, J. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 69, n. 3, p. 371–379, 2014.
- VARNEK, A.; FOURCHES, D.; SIEFFERT, N.; SOLOV'EV, V. P.; HILL, C.; LECOMTE, M. QSPR Modeling of the Am III /Eu III Separation Factor: How Far Can we Predict? **Solvent extraction and ion exchange**, v. 25, n. 1, p. 1–26, 2007.
- VEGA. **Skin Sensitization Model v. 2.1.1**. Disponível em: <http://www.vega-qsar.eu/guidelines/VEGA_model_guide_SKIN_2_1_1.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2014.
- VOCANSON, M.; GOUJON, C.; CHABEAU, G.; CASTELAIN, M.; VALEYRIE, M.; FLOC'H, F.; MALIVERNEY, C.; GARD, A.; NICOLAS, J. F. The skin allergenic properties of chemicals may depend on contaminants - Evidence from studies on coumarin. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 140, n. 3, p. 231–238, 2006.
- WALTER, K. **New System Predicts Risk for Chemical Products**. Disponível em: <<http://www.rdmag.com/article/2016/11/new-system-predicts-risk-chemical-products-2>>. Acesso em: 29 mar. 2017.
- WANG, X. S.; TANG, H.; GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Combinatorial QSAR modeling of specificity and subtype selectivity of ligands binding to serotonin receptors 5HT1E and 5HT1F. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 5, p. 997–1013, 2008.
- WANTKE, F.; GÖTZ, M.; JARISCH, R. Contact dermatitis due to henna, solvent red 1 and solvent red 3. A case report. **Contact dermatitis**, v. 27, n. 5, p. 346–347, 1992.
- WATANABE, K. H.; ANDERSEN, M. E.; BASU, N.; CARVAN, M. J.; CROFTON, K. M.; KING, K. A.; SUÑOL, C.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E.; SCHULTZ, I. R. Defining and modeling known adverse outcome pathways: domoic acid and neuronal signaling as a case study. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 30, n. 1, p. 9–21, 2011.
- WELLING, M. **A first encounter with Machine Learning**. Irvine, CA.: University of California, 2011.

- YOUNG, D. C. **Computational drug design: A guide for computational and medicinal chemists**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2009. v. 14
- YUAN, H.; HUANG, J.; CAO, C. Prediction of skin sensitization with a particle swarm optimized support vector machine. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 7, p. 3237–3254, 2009.
- ZAKHAROV, A. V.; VARLAMOVA, E. V.; LAGUNIN, A. A.; DMITRIEV, A. V.; MURATOV, E. N.; FOURCHES, D.; KUZ'MIN, V. E.; POROIKOV, V. V.; TROPSHA, A.; NICKLAUS, M. C. QSAR Modeling and Prediction of Drug–Drug Interactions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 545–556, 2016.
- ZAKHAROV, A. V.; LAGUNIN, A. A.; FILIMONOV, D. A.; POROIKOV, V. V. Quantitative prediction of antitarget interaction profiles for chemical compounds. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 11, p. 2378–2385, 2012.
- ZAKHAROV, A. V.; PEACH, M. L.; SITZMANN, M.; NICKLAUS, M. C. A new approach to radial basis function approximation and its application to QSAR. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 3, p. 713–719, 2014.
- ZHU, H.; TROPSHA, A.; FOURCHES, D.; VARNEK, A.; PAPA, E.; GRAMATICA, P.; OBERG, T.; DAO, P.; CHERKASOV, A.; TETKO, I. V. Combinatorial QSAR modeling of chemical toxicants tested against *Tetrahymena pyriformis*. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 4, p. 766–784, 2008.

Tabela A1. Lista completa dos compostos químicos e dados experimentais de sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A) e murina (LLNA, Conjunto de dados B).

#	Chemical name	CASRN	LLNA results					Human results			
			N	EC3 (%)	Class	EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	EC3 (mol/m^2)	N	DSA ₀₅ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DSA ₀₅ (mol/m^2)	Class
1	1-Octen-3-yl acetate	2442-10-6	1	NC	0	NC		1	6712	3.95	1
2	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	24	0.04	3	11	0.0054	2	3.4	0.0017	2
3	2-Hexylidene cyclopentanone	17373-89-6	1	2.4	2	600	0.3614	1	255	0.1536	2
4	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	6	2.6	2	645	0.3862	2	1930	1.1557	1
5	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	2	0.04	3	8.8	0.0025	4	27	0.0077	2
6	3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	2	4.3	2	1067	0.7209	2	759	0.5128	1
7	4-phenylenediamine	106-50-3	17	0.12	3	29.7	0.0275	4	30	0.0278	2
8	Aniline	62-53-3	5	33	1	8129	8.7409	1	2463	2.6484	1
9	Benzisothiazolone	2634-33-5	4	7.79	2	1948	1.2901	1	50	0.0331	2
10	Benzocaine	94-09-7	7	7.8	2	1948	1.1806	4	10140	6.1455	1
11	Benzoyl peroxide	94-36-0	6	0.07	3	17	0.0070	5	1283	0.5302	1
12	Benzyl alcohol	100-51-6	1	NC	0	NC		1	48670	45.06	1
13	Benzylidene acetone	122-57-6	1	3.7	2	925	0.6336	2	299	0.2048	2
14	Bourgeonal	18127-01-0	1	4.3	2	1075	0.5658	1	1541	0.8111	1
15	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	1	30.9	1	7725	5.9423	1	437	0.3362	2
16	Carvone	6485-40-1	4	10	2	2514	1.6760	1	19284	12.8560	1
17	Chlorpromazine	50-53-3	2	5.8	2	1455	0.4568	1	1149	0.3608	1
18	Cinnamic aldehyde	104-55-2	27	1	3	254	0.1924	5	382	0.2894	2
19	Cinnamyl alcohol	104-54-1	2	20	1	5007	3.7366	6	3002	2.2403	1

Tabela A1. Continuação.

#	Chemical name	CASRN	LLNA results					Human results			
			N	EC3 (%)	Class	EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	EC3 (mol/m^2)	N	DSA ₀₅ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DSA ₀₅ (mol/m^2)	Class
20	Cinnamyl nitrile	4360-47-8	1	NC	0	NC		1	1828	1.42	1
21	Citral	5392-40-5	16	5	2	1246	0.8197	5	915	0.6020	1
22	Coumarin	91-64-5	2	30	1	7395	5.0651	2	14523	9.9473	1
23	Diethyl maleate	141-05-9	4	3.27	2	818	0.4756	2	400	0.2326	2
24	Diethylenetriamine	111-40-0	1	3.3	2	825	0.8010	1	411	0.3990	2
25	<i>d</i> -Citronellol	26489-01-0	1	44	1	10875	6.9712	1	1429	0.9160	1
26	Ethyl acrylate	140-88-5	2	32	1	8125	8.1250	3	818	0.8180	1
27	Ethylenediamine	107-15-3	2	2.7	2	684	1.1400	1	732	1.2200	1
28	Eugenol	97-53-0	23	11	1	2743	1.6726	1	5926	3.6134	1
29	Farnesol	4602-84-0	2	4.7	2	1187	0.5347	1	2593	1.1680	1
30	Formaldehyde	50-00-0	21	1.4	2	344	1.1467	2	191	0.6367	2
31	Geraniol	106-24-1	7	18	1	4474	2.9052	2	1265	0.8214	1
32	Glutaraldehyde	111-30-8	8	0.16	3	41	0.0410	1	1073	1.0730	1
33	Glyoxal	107-22-2	3	0.75	3	187	0.3224	1	345	0.5948	2
34	Hydroxycitronellal	107-75-5	13	23	1	5764	3.3512	8	5237	3.0448	1
35	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	1	24	1	6000	1.5464	1	3846	0.9912	1
36	Isocyclogeraniol	68527-77-5	1	NC	0	NC		1	6250	4.06	1
37	Isoeugenol	97-54-1	66	1.4	2	342	0.2085	2	1016	0.6195	1
38	Kanamycin	25389-94-0	1	NC	0	NC		1	1874	0.39	1
39	Lilial	80-54-6	6	8.8	2	2194	1.0755	1	335545	164.4828	1
40	Menthadiene-7-methyl formate	68683-20-5	2	NC	0	NC		1	3406	1.76	1
41	Methyl 2-nonynoate	111-80-8	1	2.5	2	625	0.3720	1	79	0.0470	2
42	Methyl 2-octynoate	111-12-6	1	0.5	3	125	0.0812	1	388	0.2519	2
43	Methylanisylidene acetone	104-27-8	1	9.3	2	2325	1.2237	1	412	0.2168	2
44	Methylhexanedione	13706-86-0	1	26	1	6450	5.0391	2	3258	2.5453	1
45	Methylisothiazolinone	2682-20-4	2	0.87	3	218	0.1896	2	223.5	0.1943	2

Tabela A1. Continuação.

#	Chemical name	CASRN	LLNA results					Human results			
			N	EC3 (%)	Class	EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	EC3 (mol/m^2)	N	DSA ₀₅ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DSA ₀₅ (mol/m^2)	Class
46	Neomycin	1405-10-3	1	NC	0	NC		5	3466	0.56	1
47	Penicillin G	61-33-6	11	17	1	4338	1.2988	4	634	0.1898	1
48	Pentachlorophenol	87-86-5	1	20	1	5000	1.8762	1	2155	0.8086	1
49	Pentaerythritol triacrylate	3524-68-3	1	NC	0	NC		1	576	0.19	1
50	Perillaldehyde	2111-75-3	3	7.9	2	1987	1.3247	1	1484	0.9893	1
51	Phenyl benzoate	93-99-2	4	9.5	2	2366	1.1949	1	52489	26.5096	1
52	Phenylacetaldehyde	122-78-1	3	4.99	2	1247	1.0392	5	329	0.2742	2
53	Phenylpropionaldehyde	1335-10-0	1	6.3	2	1575	1.1754	1	692	0.5164	1
54	<i>p</i> -methylhydrocinnamic aldehyde	5406-12-2	4	18	1	4417	2.9845	1	2378	1.6068	1
55	Propylidene phthalate	17369-59-4	1	3.7	2	925	0.5316	1	1150	0.6609	1
56	Pyridine	110-86-1	1	72	1	17975	22.7532	1	41051	51.9633	1
57	Streptomycin	3810-74-0	4	NC	0	NC		6	245	0.04	2
58	Sulfanilamide	63-74-1	1	NC	0	NC		1	4310	2.51	1
59	<i>t</i> -2-Hexenal	6728-26-3	2	3.78	2	945	0.9643	1	49	0.0500	2
60	Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	2	5.6	2	1396	0.5817	2	4544	1.8933	1
61	Thioglycerol	96-27-5	1	3.6	2	895	0.8287	3	1232	1.1407	1
62	α -amylcinnamyl alcohol	101-85-9	2	NC	0	NC		1	12308	6.03	1
63	δ -damascone	57378-68-4	3	3.51	2	877	0.4568	1	193	0.1005	2
64	2-Methoxy-4-methylphenol	93-51-6	1	5.8	2	1450	1.0507	1			0
65	4-Methoxyacetophenone	100-06-1	1	NC	0	NC		1			0
66	6-Methylcoumarin	92-48-8	2	NC	0	NC		1			0
67	Anisyl alcohol	1331-81-3	1	5.9	2	1475	1.0688	1			0
68	Benzoic acid	65-85-0	1	NC	0	NC		1			0
69	Benzyl benzoate	120-51-4	1	17	1	4250	2.0047	2			0
70	Benzyl cinnamate	103-41-3	1	18	1	4600	1.9328	2			0
71	Benzyl salicylate	118-58-1	1	2.9	2	725	0.3180	2			0

Tabela A1. Continuação.

#	Chemical name	CASRN	LLNA results					Human results			
			N	EC3 (%)	Class	EC3 (µg/cm ²)	EC3 (mol/m ²)	N	DSA ₀₅ (µg/cm ²)	DSA ₀₅ (mol/m ²)	Class
72	Butanol	71-36-3	1	NC	0	NC		NA			0
73	Citronella oil	8000-29-1	1	NC	0	NC		1			0
74	Cyclamen aldehyde	103-95-7	1	22	1	5575	2.9342	1			0
75	Damascone	23696-85-7	2	1.2	2	307	0.1616	1			0
76	Diethyl phthalate	84-66-2	1	NC	0	NC		1			0
77	Dimethyl sulfoxide	67-68-5	1	72	1	18000	23.0769	1			0
78	<i>d</i> -Limonene	5989-27-5	6	32	1	32	0.0235	2			0
79	Ethyl vanillin	121-32-4	1	NC	0	NC		NA			0
80	Glycerol	56-81-5	1	NC	0	NC		1			0
81	Hexane	110-54-3	1	NC	0	NC		1			0
82	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	27	8.9	2	2233	1.0338	1			0
83	Hexyl salicylate	6259-76-3	1	0.18	3	45	0.0203	2			0
84	Hydrocortisone	50-23-7	1	NC	0	NC		1			0
85	Isocyclemone E	54464-57-2	1	25	1	6285	2.6859	1			0
86	Isocyclocitral	1335-66-6	1	7.4	2	1838	1.2092	2			0
87	Isomethyl- α -ionone	127-51-5	1	21.8	1	5450	2.6456	1			0
88	Isopropanol	67-63-0	1	NC	0	NC		1			0
89	Isopropyl myristate	110-27-0	1	44	1	11000	4.0741	1			0
90	Lead acetate	301-04-2	1	NC	0	NC		NA			0
91	Linalool	78-70-6	1	55	1	13750	8.9286	3			0
92	Lylal	31906-04-4	2	17	1	4262	2.0295	2			0
93	Majantal	103694-68-4	1	NC	0	NC		1			0
94	Methoxy dicyclopentadiene carboxaldehyde	86803-90-9	1	NC	0	NC		1			0
95	Methyl salicylate	119-36-8	2	17	1	4239	2.7888	1			0
96	Octanoic acid	124-07-2	1	NC	0	NC		1			0

Tabela A1. Continuação.

#	Chemical name	CASRN	LLNA results					Human results			
			N	EC3 (%)	Class	EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	EC3 (mol/m^2)	N	DSA ₀₅ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DSA ₀₅ (mol/m^2)	Class
97	<i>p</i> -aminobenzoic acid	150-13-0	1	NC	0	NC		1			0
98	Propylene glycol	57-55-6	1	NC	0	NC		2			0
99	Resorcinol	108-46-3	2	5.9	2	1481	1.3464	1			0
100	Salicylic acid	69-72-7	1	12	1	3056	2.2145	1			0
101	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	10	4	2	1001	0.3763	1			0
102	Sulfanilic acid	121-57-3	4	NC	0	NC		NA			0
103	Tartaric acid	87-69-4	1	NC	0	NC		NA			0
104	Tween 80	9005-65-6	1	NC	0	NC		1			0
105	Xylene	1330-20-7	1	96	1	23950	22.5943	1			0
106	α -amylcinnamic aldehyde	122-40-7	5	11	1	2699	1.3361	1			0
107	α -damascone	24720-09-0	1	3.3	2	825	0.4297	1			0
108	α -methyl cinnamic aldehyde	101-39-3	1	4.5	2	1125	0.7705	2			0
109	β -damascone	23726-91-2	1	2.4	2	600		2			0
110	(Chloro)methylisothiazolinone (Kathon)	2682-20-4 26172-55-4	13	0.01	3	2.8	0.0019	5	5	0.0033	2
111	Aluminum chloride	7446-70-0	1	NC	0	NC		NA			0
112	Basil oil	8015-73-4	1	6.2	2	1550		1			0
113	Benzalkonium chloride	8001-54-5	1	0.07	3	17		2			0
114	Beryllium sulfate	7787-56-6	1	0.68	3	170		1	11	0.0105	2
115	Clove oils	8000-34-8	3	7.1	2	1775		3			0
116	Cobalt (II) salts	7646-79-9 10124-43-3	2	0.57	3	141		2	279		2
117	Copper (II) chloride	7447-39-4	1	0.4	3	100		NA			0
118	Geranium oil	8000-46-2	1	NC	0	NC		1			0
119	Gold (III) chloride	13453-07-1	1	0.48	3	120		1	98.5	0.0424	2
121	Jasmine absolute (sambac)	92457-01-8	1	36	1	9100		1			0
122	Lemongrass oil	8007-02-1	1	6.5	2	1625		1			0

Tabela A1. Continuação.

#	Chemical name	CASRN	LLNA results					Human results			
			N	EC3 (%)	Class	EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	EC3 (mol/m^2)	N	DSA ₀₅ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DSA ₀₅ (mol/m^2)	Class
123	Litsea cubeba oil	68855-99-2	1	8.4	2	2100	1			0	
124	Manganese chloride	7773-01-5	1	NC	0	NC	NA			0	
125	Mercuric (II) chloride	7487-94-7	1	0.39	3	98	2	225	0.0829	2	
126	Nickel (II) salts	7718-54-9 7786-81-4	8	NC	0	NC	3	27		2	
127	Oakmoss	68917-10-2	1	3.8	2	950	1	3374		1	
128	Palmarosa oil	8014-19-5	1	9.6	2	2400	1			0	
129	Peru balsam absolute	8007-00-9	1	2.5	2	625	1	862		1	
130	Potassium dichromate	7778-50-9	19	0.12	3	30	3	106		2	
131	Spearmint oil	8008-79-5	1	8.2	2	2050	1			0	
132	Tea leaf absolute	84650-60-2	1	NC	0	NC	1			0	
133	Treemoss	68648-41-9	1	NC	0	NC	1	3423		1	
134	Ylang ylang	8006-81-3 68606-83-7	1	6.8	2	1700	1	16150		1	
135	Zinc sulfate	83863-30-3 7733-02-0	1	NC	0	NC	NA			0	

CASRN: *Chemical Abstract Registry Number*; Class: 0 – não-sensibilizador, 1 – fraco, 2 – moderado, 3 – forte/moderado; DSA₀₅: dose por área de pele que produz uma resposta positiva em 5% da população testada; EC3: a dose que produz o índice de estimulação de três, o limiar para uma resposta positiva no LLNA; N: número de registros; NA: *not available*; NC: *not counted* (não-sensibilizador).

Tabela A2. Número de registros, resultados de ensaios e predições de QSAR para as 62 substâncias com vários registros presentes no conjunto de dados sensibilização cutânea humana (Conjunto de Dados A).

#	Nome do composto	CASRN	No. de registros	No. de Sens.	No. de Não sens.	QSAR
1	(Cloro)metilisotia-zolinona (Kathon)	26172-55-4	14	4	10	Não predito
2	Hidroxicitronelal	107-75-5	12	8	4	Sensibilizador
3	Álcool de cinamila	104-54-1	10	6	4	Sensibilizador
4	Aldeído cinâmico	104-55-2	8	5	3	Sensibilizador
5	Citral	5392-40-5	7	5	2	Não-sensibilizador
6	Estreptomicina	3810-74-0	6	6	0	Sensibilizador
7	Fenilacetaldéido	122-78-1	6	5	1	Não-sensibilizador
8	Geraniol	106-24-1	6	2	4	Sensibilizador
9	Peróxido de benzoíla	94-36-0	5	5	0	Não-sensibilizador
10	Sulfato de neomicina	1405/10/03	5	5	0	Sensibilizador
11	Penicilina G	61-33-6	5	4	1	Sensibilizador
12	Benzocaína	94-09-7	5	4	1	Sensibilizador
13	Acrilato de etila	140-88-5	5	3	2	Sensibilizador
14	Metilisotiazolinona	2682-20-4	5	2	3	Sensibilizador
15	Cumarina	91-64-5	5	2	3	Sensibilizador
16	Eugenol	97-53-0	5	1	4	Sensibilizador
17	Citronelol	26489-01-0	5	1	4	Não-sensibilizador
18	4-fenilenodiamina	106-50-3	4	4	0	Sensibilizador
19	Metilhexanediona	13706-86-0	4	4	0	Não-sensibilizador
20	Tetraclorosalicilanilida	1154-59-2	4	4	0	Sensibilizador
21	Isoeugenol	97-54-1	4	2	2	Não-sensibilizador
22	Lilial	80-54-6	4	1	3	Sensibilizador
23	Cinamil nitrila	4360-47-8	4	1	3	Sensibilizador
24	Dicromato de potássio	7778-50-9	3	3	0	Não predito
25	Tioglicerol	96-27-5	3	3	0	Não-sensibilizador
26	Sais de níquel (II)	7718-54-9; 7786-81-4	3	3	0	Não predito
27	Formaldeído	50-00-0	3	2	1	Sensibilizador
28	Tetramethylthiuram-dissulfureto	137-26-8	3	2	1	Sensibilizador
29	Ftalato de propilideno	17369-59-4	3	1	2	Não-sensibilizador
30	Álcool amilcinamílico	101-85-9	3	1	2	Não-sensibilizador

Tabela A2. Continuação.

#	Nome do composto	CASRN	No. de registros	No. de Sens.	No. de Não sens.	QSAR
31	Álcool benzílico	100-51-6	3	1	2	Não-sensibilizador
32	Musgo de carvalho	68917-10-2	3	1	2	Não predito
33	Musgo de árvore	68648-41-9	3	1	2	Não predito
34	Linalol	78-70-6	3	0	3	Não-sensibilizador
35	Óleo de cravo (broto, folha, caule)	8000-34-8	3	0	3	Não predito
36	2,4-dinitroclorobenzeno	97-00-7	2	2	0	Sensibilizador
37	2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	2	2	0	Sensibilizador
38	Benzilideno acetona	122-57-6	2	2	0	Não-sensibilizador
39	Dietilmaleato	141-05-9	2	2	0	Sensibilizador
40	Dihidroocumarina	119-84-6	2	2	0	Não-sensibilizador
41	Sais de cobalto (II)	7646-79-9 10124-43-3	2	2	0	Não predito
42	Cloreto de mercúrico (II)	7487-94-7	2	2	0	Não predito
43	Benzoisotiazoliona	2634-33-5	2	1	1	Sensibilizador
44	Farnesol	4602-84-0	2	1	1	Sensibilizador
45	Glutaraldeído	111-30-8	2	1	1	Sensibilizador
46	Ureia imidazolidinil	39236-46-9	2	1	1	Sensibilizador
47	Isociclogeraniol	68527-77-5	2	1	1	Não-sensibilizador
48	Metil 2-noninoato	111-80-8	2	1	1	Sensibilizador
49	Metil 2-octinoato	111-12-6	2	1	1	Sensibilizador
50	Aldeído <i>p</i> -metilhidrocínamico	5406-12-2	2	1	1	Sensibilizador
51	<i>trans</i> -2-hexenal	6728-26-3	2	1	1	Sensibilizador
52	Ylang ylang	8006-81-3; 68606-83-7; 83863-30-3	2	1	1	Não predito
53	Aldeído α -metil cinâmico	101-39-3	2	0	2	Não-sensibilizador
54	Cinamato de benzila	103-41-3	2	0	2	Não-sensibilizador
55	Salicilato de benzila	118-58-1	2	0	2	Não-sensibilizador
56	Benzoato de benzila	120-51-4	2	0	2	Não-sensibilizador
57	<i>D</i> -limoneno	5989-27-5	2	0	2	Sensibilizador
58	Isociclocitral	1335-66-6	2	0	2	Não-sensibilizador
59	Liral	31906-04-4	2	0	2	Sensibilizador

Tabela A2. Continuação.

#	Nome do composto	CASRN	No. de registros	No. de Sens.	No. de Não sens.	QSAR
60	Propileno glicol	57-55-6	2	0	2	Sensibilizador
61	β -damascona	23726-91-2	2	0	2	Não-sensibilizador
62	Cloreto de benzalcônio	8001-54-5	2	0	2	Não predito

Tabela A3. Número de registros, resultados dos experimentos para as 19 substâncias com diferentes anotações entre os registros presentes no conjunto de dados sensibilização cutânea murina (Conjunto de Dados B).

#	Nome do composto	CASRN	No. de registros	No. de sensibilizadores	No. de não-sensibilizadores
1	Aldeído hexil cinâmico	101-86-0	44	42	2
2	Eugenol	97-53-0	31	30	1
3	Benzocaína	94-09-7	24	7	17
4	Sais de níquel (II)	7718-54-9; 7786-81-4	16	5	11
5	Salicilato de metila	119-36-8	14	2	12
6	Lauril sulfato de sódio	151-21-3	11	10	1
7	Anilina	62-53-3	11	6	5
8	Dicromato de potássio	7778-50-9	10	9	1
9	2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	8	6	2
10	Geraniol	106-24-1	7	6	1
11	Tetrametiltiuramdissulfeto	137-26-8	7	6	1
12	Estreptomina	3810-74-0	6	2	4
13	Cumarina	91-64-5	4	2	2
14	Acrilato de etila	140-88-5	3	2	1
15	Sulfato de zinco	7733-02-0	3	2	1
16	Resorcinol	108-46-3	3	1	2
17	Benzoato de benzila	120-51-4	2	1	1
18	Etilenodiamina	107-15-3	2	1	1
19	Ácido salicílico	69-72-7	2	1	1

Tabela A4. Resultados experimentais do LLNA, predições de QSAR, predições do modelo combinado de LLNA e QSAR e grupo correspondente para cada molécula.

#	Nome do compostos	CASRN	Dados humanos	LLNA	QSAR	Combinado	Grupo
1	1-Octen-3-yl acetate	2442-10-6	1	0	0	0	7
2	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	1	1	1	1	22
3	2-Hexylidene cyclopentanone	17373-89-6	1	1	0		12
4	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1	1	1	1	1
5	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	1	1	1	1	22
6	3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	1	1	0		6
7	4-phenylenediamine	106-50-3	1	1	1	1	2
8	Aniline	62-53-3	1	1	1	1	2
9	Benzisothiazolone	2634-33-5	1	1	1	1	1
10	Benzocaine	94-09-7	1	1	1	1	19
11	Benzoyl peroxide	94-36-0	1	1	0		3
12	Benzyl alcohol	100-51-6	1	0	0	0	1
13	Benzylidene acetone	122-57-6	1	1	0		4
14	Bourgeonal	18127-01-0	1	1	1	1	11
15	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	1	1	0		10
16	Carvone	99-49-0; 2244-16-8; 6485-40-2	1	1	0		9
17	Chlorpromazine	50-53-3	1	1	1	1	18
18	Cinnamic aldehyde	104-55-2	1	1	1	1	4
19	Cinnamyl alcohol	104-54-1	1	1	1	1	4
20	Cinnamyl nitrile	4360-47-8	1	0	1		4
21	Citral	5392-40-5	1	1	0		13
22	Coumarin	91-64-5	1	1	1	1	6
23	Diethyl maleate	141-05-9	1	1	1	1	19
24	Diethylenetriamine	111-40-0	1	1	1	1	19
25	<i>d</i> -Citronellol	26489-01-0	1	1	0		12
26	Ethyl acrylate	140-88-5	1	1	1	1	19

Tabela A4. Continuação.

#	Nome do compostos	CASRN	Dados humanos	LLNA	QSAR	Combinado	Grupo
27	Ethylenediamine	107-15-3	1	1	1	1	19
28	Eugenol	97-53-0	1	1	1	1	5
29	Farnesol	4602-84-0	1	1	1	1	13
30	Formaldehyde	50-00-0	1	1	1	1	20
31	Geraniol	106-24-1	1	1	1	1	13
32	Glutaraldehyde	111-30-8	1	1	1	1	10
33	Glyoxal	107-22-2	1	1	1	1	20
34	Hydroxycitronellal	107-75-5	1	1	0		15
35	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	1	1	1	1	18
36	Isocyclogeraniol	68527-77-5	1	0	0	0	14
37	Isoeugenol	97-54-1	1	1	0		5
38	Kanamycin	59-01-8; 8063-07-8	1	0	1		17
39	Lilial	80-54-6	1	1	1	1	11
40	Menthadiene-7-methyl formate	68683-20-5	1	0	0	0	9
41	Methyl 2-nonynoate	111-80-8	1	1	1	1	7
42	Methyl 2-octynoate	111-12-6	1	1	1	1	7
43	Methylanisylidene acetone	104-27-8	1	1	1	1	5
44	Methylhexanedione	13706-86-0	1	1	0		7
45	Methylisothiazolinone	2682-20-4	1	1	1	1	20
46	Neomycin	1405-10-3	1	0	1		17
47	Penicillin G	61-33-6	1	1	1	1	12
48	Pentachlorophenol	87-86-5	1	1	1	1	22
49	Pentaerythritol triacrylate	3524-68-3	1	0	1		23
50	Perillaldehyde	2111-75-3	1	1	1	1	9
51	Phenyl benzoate	93-99-2	1	1	1	1	3
52	Phenylacetaldehyde	122-78-1	1	1	0		4
53	Phenylpropionaldehyde	1335-10-0	1	1	0		6

Tabela A4. Continuação.

#	Nome do compostos	CASRN	Dados humanos	LLNA	QSAR	Combinado	Grupo
54	<i>p</i> -methylhydrocinnamic aldehyde	5406-12-2	1	1	0		6
55	Propylidene phthalate	17369-59-4	1	1	0		1
56	Pyridine	110-86-1	1	1	1	1	2
57	Streptomycin	3810-74-0	1	0	1		17
58	Sulfanilamide	63-74-1	1	0	1		2
59	<i>t</i> -2-Hexenal	6728-26-3	1	1	1	1	10
60	Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	1	1	1	1	18
61	Thioglycerol	96-27-5	1	1	0		21
62	α -amylcinnamyl alcohol	101-85-9	1	0	0	0	8
63	δ -damascone	57378-68-4	1	1	0		14
64	2-Methoxy-4-methylphenol	93-51-6	0	1	0		5
65	4-Methoxyacetophenone	100-06-1	0	0	1		5
66	6-Methylcoumarin	92-48-8	0	0	0	0	6
67	Anisyl alcohol	1331-81-3	0	1	0		5
68	Benzoic acid	65-85-0	0	0	0	0	1
69	Benzyl benzoate	120-51-4	0	1	0		3
70	Benzyl cinnamate	103-41-3	0	1	0		3
71	Benzyl salicylate	118-58-1	0	1	0		3
72	Butanol	71-36-3	0	0	0	0	10
73	Citronella oil	26489-02-1	0	0	0	0	12
74	Cyclamen aldehyde	103-95-7	0	1	1	1	11
75	Damascone	23696-85-7	0	1	0		14
76	Diethyl phthalate	84-66-2	0	0	1		19
77	Dimethyl sulfoxide	67-68-5	0	1	1	1	20
78	<i>d</i> -Limonene	5989-27-5	0	1	1	1	9
79	Ethyl vanillin	121-32-4	0	0	0	0	5
80	Glycerol	56-81-5	0	0	0	0	21

Tabela A4. Continuação.

#	Nome do compostos	CASRN	Dados humanos	LLNA	QSAR	Combinado	Grupo
81	Hexane	110-54-3	0	0	0	0	7
82	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	0	1	0		8
83	Hexyl salicylate	6259-76-3	0	1	0		3
84	Hydrocortisone	50-23-7	0	0	0	0	16
85	Isocyclemone E	54464-57-2	0	1	1	1	16
86	Isocyclocitral	1335-66-6	0	1	0		14
87	Isomethyl- α -ionone	127-51-5	0	1	0		14
88	Isopropanol	67-63-0	0	0	0	0	21
89	Isopropyl myristate	110-27-0	0	1	0		23
90	Lead acetate	15347-57-6	0	0	0	0	20
91	Linalool	78-70-6	0	1	0		13
92	Lylal	31906-04-4	0	1	0		15
93	Majantal	103694-68-4	0	0	1		11
94	Methoxy dicyclopentadiene carboxaldehyde	86803-90-9	0	0	1		15
95	Methyl salicylate	119-36-8	0	1	0		1
96	Octanoic acid	124-07-2	0	0	0	0	7
97	<i>p</i> -aminobenzoic acid	150-13-0	0	0	1		2
98	Propylene glycol	57-55-6	0	0	0	0	21
99	Resorcinol	108-46-3	0	1	0		1
100	Salicylic acid	69-72-7	0	1	0		1
101	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	0	1	0		23
102	Sulfanilic acid	121-57-3	0	0	1		2
103	Tartaric acid	87-69-4	0	0	0	0	21
104	Tween 80	9005-65-6	0	0	1		16
105	Xylene	1330-20-7	0	1	0		6
106	α -amylcinnamic aldehyde	122-40-7	0	1	0		8
107	α -damascone	24720-09-0	0	1	0		14

Tabela A4. Continuação.

#	Nome do compostos	CASRN	Dados humanos	LLNA	QSAR	Combinado	Grupo
108	α -methyl cinnamic aldehyde	101-39-3	0	1	0		8
109	β -damascone	23726-91-2	0	1	0		14