



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

EDER SOARES DE ALMEIDA SANTOS

**FERRAMENTA BASEADA EM APRENDIZAGEM MULTITAREFA
PARA A PREDIÇÃO DE MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO
ENDÓCRINA**

GOIÂNIA - GO

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

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

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

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

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

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

EDER SOARES DE ALMEIDA SANTOS

3. Título do trabalho

FERRAMENTA BASEADA EM APRENDIZAGEM MULTITAREFA PARA A PREDIÇÃO DE MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA

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

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Junior Neves, Professor do Magistério Superior**, em 06/03/2026, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eder Soares De Almeida Santos, Discente**, em 06/03/2026, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6033932** e o código CRC **77680B60**.

EDER SOARES DE ALMEIDA SANTOS

**FERRAMENTA BASEADA EM APRENDIZAGEM MULTITAREFA
PARA A PREDIÇÃO DE MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO
ENDÓCRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade Farmácia (FF) da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador(a): Dr. Bruno Junior Neves

GOIÂNIA

2026

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

Santos, Eder Soares de Almeida
FERRAMENTA BASEADA EM APRENDIZAGEM MULTITAREFA PARA A
PREDIÇÃO DE MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA [manuscrito] /
Eder Soares de Almeida Santos. - 2026.
CXIX, 119 f.: 2026

Orientador: Prof. Dr. Bruno Junior Neves
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia,
2026.

1. QSAR. 2. Aprendizagem de Máquina. 3. Desreguladores Endócrinos.
4. AOP.

I. Neves, Bruno Junior, orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº **255** da sessão de Defesa de Dissertação de **EDER SOARES DE ALMEIDA SANTOS** que confere o título de Mestre em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **cinco dias do mês de agosto de dois mil e vinte e cinco**, através de **vídeoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“FERRAMENTA BASEADA EM APRENDIZAGEM MULTITAREFA PARA A PREDIÇÃO DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Bruno Junior Neves (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de vídeoconferência**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professor Doutor Artur Christian Garcia da Silva (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de vídeoconferência**, membro titular interno; **Professor Doutor Rodolpho de Campos Braga (InsilicAll) - cuja participação ocorreu através de vídeoconferência**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Bruno Junior Neves (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de vídeoconferência**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **cinco dias do mês de agosto de dois mil e vinte e cinco**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

FERRAMENTA BASEADA EM APRENDIZAGEM MULTITAREFA PARA A PREDIÇÃO DE MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA



Documento assinado eletronicamente por **RODOLPHO DE CAMPOS BRAGA, Usuário Externo**, em 05/08/2025, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Junior Neves, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2025, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Artur Christian Garcia Da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2025, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5482123** e o código CRC **8C2B90CA**.

Referência: Processo nº 23070.034439/2025-74

SEI nº 5482123



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

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof(a). Dr(a). Stephânia Fleury Taveira

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof(a) Dr(a). Carolina Horta Andrade

Goiânia - GO

2025



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

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Eder Soares de Almeida Santos

Orientador(a): Bruno Junior Neves

Bruno Junior Neves

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

Rodolpho de Campos Braga / Membro Titular

CTO InsilicAll Ltda

Artur Christian Garcia da Silva / Membro Titular

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

Luís Antônio Dantas Silva / Membro Suplente

Professor(a) Associado(a) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Eugene N. Muratov / Membro Suplente

Pesquisador Associado da The University of North Carolina at Chapel Hill, UNC-USA.

Data: 05 de agosto de 2025

AGRADECIMENTOS

Expresso minha mais profunda gratidão à minha mãe, Haidee Soares de Almeida, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por ter sido, desde a infância, o alicerce da minha busca por conhecimento. Sua dedicação, força e fé foram essenciais em cada etapa desta caminhada acadêmica. Este trabalho é também fruto do seu exemplo e da sua coragem.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Junior Neves, por sua orientação segura, paciência, disponibilidade e profissionalismo ao longo de toda a minha formação. Agradeço não apenas pela orientação técnica e científica durante o mestrado, mas também pelo apoio desde os anos da graduação. Sua confiança e incentivo foram decisivos para que eu pudesse enfrentar os desafios da vida acadêmica e amadurecer como pesquisador.

Aos colegas e amigos do Laboratory of Cheminformatics (LCi), minha sincera gratidão pelas trocas de conhecimento, colaborações, apoio mútuo e momentos compartilhados. A convivência com vocês foi essencial para meu crescimento pessoal e científico. Obrigado por contribuírem para um ambiente de pesquisa estimulante, respeitoso e humano.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, por ter sido muito mais do que um espaço de formação: foi um verdadeiro lar acadêmico. A instituição me acolheu desde os primeiros passos na graduação até a finalização do mestrado, oferecendo uma base sólida de ensino, pesquisa e convivência que levarei comigo por toda a vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos, desenvolver habilidades críticas e construir uma trajetória científica pautada na ética e no compromisso com a saúde pública. Sou grato por ter feito parte deste espaço de excelência e formação qualificada.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo apoio ao financiamento de equipamentos e infraestrutura do laboratório, que viabilizaram a execução deste trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste mestrado — com palavras de incentivo, conselhos, colaborações científicas ou gestos de generosidade — o meu muito obrigado. Este trabalho é resultado de muitas mãos, mentes e esforços que caminharam comigo.

Dedico este trabalho à minha mãe, Haidee Soares de Almeida, em reconhecimento a todos os esforços e à confiança que sempre depositou em minha trajetória.

Ferramenta Baseada em Aprendizagem Multitarefa para a Predição de Mecanismos de Desregulação Endócrina**Almeida Santos, E. S. ¹, Pereira, E. S. ¹, Neves, B. J. ¹**¹Laboratory of Cheminformatics (LCi), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Introdução: Os desreguladores endócrinos são substâncias exógenas ou misturas cuja ação altera as funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, ocasiona efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, sua progênie, populações ou subpopulações. Atualmente, os estudos sobre a toxicidade relacionada aos desreguladores endócrinos podem ser conduzidos por meio de abordagens *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a implementação desses ensaios experimentais enfrenta numerosos desafios, incluindo a limitada capacidade de processamento de dados diante do enorme volume de substâncias químicas comerciais, a complexidade operacional dos testes e as preocupações éticas associadas ao uso de modelos animais. **Objetivo:** Este trabalho visa desenvolver modelos de inteligência artificial que sirvam como métodos alternativos para prever a toxicidade e vias de efeitos adversos de desreguladores endócrinos potencialmente nocivos para o sistema reprodutor masculino e feminino. **Métodos:** Inicialmente, conjuntos de dados de compostos testados *in vitro* foram compilados das bases Tox21 e ToxCast, e a partir deles, foram desenvolvidos modelos de tarefa única (Random Forest, SVM, LightGBM) e multitarefa, usando fingerprints ECFP4 como descritores moleculares. **Resultados e Discussões:** Os resultados mostraram modelos preditivos, especialmente o modelo multitarefa, que apresenta uma taxa de acerto de 87% e valores balanceados de recall e especificidade (~75%) após calibração tarefa por tarefa desenvolvida *in house*. Nossos modelos de camada dois atingiram uma taxa de acerto superior a 70%, nos quais a especificidade e recall para os modelos femininos superaram 70% e para masculino os melhores resultados foram de > 50%. **Conclusão:** Em síntese, este estudo oferece métodos promissores para a identificação de substâncias com potencial de desregulação endócrina, representando uma alternativa valiosa ou um complemento aos ensaios *in vitro* e *in vivo*, destacando a relevância e o impacto potencial das ferramentas de modelagem desenvolvidas em avançar a pesquisa toxicológica e minimizar a dependência de modelos animais.

Palavras-chave: QSAR; Aprendizagem de Máquina; Desreguladores endócrinos; AOP.

Agradecimentos: CNPq, CAPES e FAPEG.

Multitask Learning-Based Tool for Predicting Endocrine Disruption Mechanisms**Almeida Santos, E. S. ¹, Pereira, E. S.¹, Neves, B. J.¹**¹Laboratory of Cheminformatics (LCi), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Introduction: Endocrine disruptors are exogenous substances or mixtures that alter the functions of the endocrine system, causing adverse effects on the health of an intact organism, its offspring, populations, or subpopulations. Currently, studies on the toxicity of endocrine disruptors chemicals can be conducted through both *in vitro* and *in vivo* approaches. However, the implementation of these experimental assays faces numerous challenges, including the limited capacity for data processing given the vast number of commercial chemicals, the operational complexity of the tests, and ethical concerns related to the use of animal models. **Objective:** this work aims to develop artificial intelligence models that serve as alternative methods to predict the toxicity and adverse effect pathways of endocrine disruptors potentially harmful to both the male and female reproductive systems. **Methods:** Initially, datasets of compounds tested *in vitro* were compiled from the Tox21 and ToxCast databases, from which single-task models (Random Forest, SVM, LightGBM) and multi-task models were developed using ECFP4 fingerprints as molecular descriptors. **Results and Discussions:** The results showed predictive models, especially the multi-task models, which achieved an accuracy rate of 87% and balanced recall and specificity values (~75%) after task-to-task calibration developed in-house. Our second-layer models achieved an accuracy rate of over 70%, with specificity and recall for the female models exceeding 70%, while the best results for the male models were over 50%. **Conclusion:** In summary, this study offers promising methods for identifying endocrine disruptors, representing a valuable alternative or complement to *in vitro* and *in vivo* assays, highlighting the relevance and potential impact of the modeling tools developed in advancing toxicological research and reducing reliance on animal models.

Keywords: QSAR; Machine Learning; Endocrine disruptor; AOP.

Acknowledgments: CNPq, CAPES e FAPEG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de sequência de eventos chaves ligadas a um evento de inicialização molecular até um desfecho adverso através de diferentes níveis de organização biológica.....	27
Figura 2: Mecanismos de respostas genômicas e não genômicas mediadas pela sinalização de hormônios de esteroides	32
Figura 3: Esquema das vias adversas relacionadas ao receptor de estrógeno baseado nos ensaios presentes nos programas ToxCast e Tox21.	33
Figura 4: Esquema das vias adversas relacionadas ao receptor de andrógeno baseado nos ensaios presentes nos programas ToxCast e Tox21.....	35
Figura 5: Esquema de etapas para construção de um modelo computacional baseado em QSAR.	48
Figura 6: Esquemas evidenciando a arquitetura de modelos de aprendizagem profunda de (a) tarefa única e (b) multitarefa	53
Figura 7: Esquema elucidando os modelos gerados para camada 1 (predição de atividade <i>in vitro</i>) e camada 2 (predição de atividade <i>in vivo</i>)	61
Figura 8: Esquemática da Via de Efeito Adverso relacionada ao receptor de estrogênio.....	73
Figura 9: Gráfico do preparo do conjunto de dados e quantidade de compostos para cada um dos ensaios relacionados ao receptor de estrogênio.	74
Figura 10: Esquemática da Via de Efeito Adverso relacionada ao receptor de androgênio.	75
Figura 11: Gráfico do preparo do conjunto de dados e quantidade de compostos para cada um dos ensaios relacionados ao receptor de androgênio.	76
Figura 12: Visualização dos dados através do <i>t</i> -SNE relacionando as estruturas dos arcabouços moleculares por meio de clusters.	77

Figura 13: Principais arcabouços moleculares detectados em cada um dos oito clusters.....	78
Figura 14: Análise de similaridade entre as estruturas químicas evidenciando o mapa de similaridade (a) e o Neighbor Tree das moléculas vizinhas (b) com exemplos das estruturas químicas: I) 9-fluoro-11,16,17-trihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one; II) anthracene-1,8,9-triol; III) 1-methylpyrrolidin-2-one; e IV) 2-N-[(2S)-butan-2-yl]-6-chloro-4-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	80
Figura 15: Mapa de correlação de calor entre os subconjuntos de dados para toxicidade masculina e feminina.....	82
Figura 16: Matriz de dispersão das propriedades físico-químicas do conjunto de dados <i>in vitro</i>	83
Figura 17: Performance da exatidão (ACC) do conjunto teste dos modelos matemáticos.....	85
Figura 18: Performance da matriz de confusão dos modelos de DNN para os três conjuntos de dados e suas respectivas distribuições de probabilidade predita.	86
Figura 19: Análise comparativa da performance dos modelos de DNN	87
Figura 20: Performance estatísticas dos conjuntos testes calibrados dos modelos multitarefa.....	88
Figura 21: Performance da matriz de confusão dos modelos de DNN calibrados para os três conjuntos de dados e suas respectivas distribuições de probabilidade predita.	89
Figura 22: Avaliação do domínio de aplicabilidade dos conjuntos de dados: (a) <i>in vitro</i> relacionado aos receptores de androgênio e estrogênio; (b) <i>in vivo</i> dos ensaios uterotróficos; e (c) <i>in vivo</i> referente aos bioensaios de <i>Hershberger</i>	95
Figura 23: Gráfico de beeswarm do SHAP global para avaliar a influência das variáveis nos modelos de (a) receptor de estrógeno; (b) agonista de receptor de andrógeno; e (c) antagonista de receptor de andrógeno	97

Figura 24: SHAP local e fragmentos moleculares (bits) para moléculas específicas relacionadas ao **(a)** receptor de estrógeno; **(b)** agonista de receptor de andrógeno; e **(c)** antagonista de receptor de andrógeno.98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação, propriedades e principais desreguladores endócrinos.....	26
Tabela 2: Ensaio <i>in vitro</i> utilizados para avaliar a Via de Efeito Adverso do receptor de estrógeno com base no ToxCast e Tox21.....	36
Tabela 3: Ensaio <i>in vitro</i> utilizados para avaliar a Via de Efeito Adverso do receptor de andrógeno com base no ToxCast e Tox21.....	40
Tabela 4: Estrutura conceitual da OECD para testes e avaliação de desreguladores endócrinos, revisado em 2017.	42
Tabela 5: Parte dos principais ensaios aprovados pelas agências reguladoras para avaliação de desreguladores endócrinos.	45
Tabela 6: Matriz da confusão de modelos de classificação binário.	66
Tabela 7: Performance estatística dos modelos de camada 2 <i>in vivo</i> divididos através do método <i>Leave-One-Out Cross Validation</i>	91
Tabela 8: Performance estatística dos conjuntos testes <i>in vivo</i> para potencial tóxico feminino e masculino divididos de forma randômica.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR	Receptor aril-hidrocarboneto
ANNs	Artificial Neural Networks
AO	Adverse Outcome
AOP	Adverse Outcome Pathway
AP-1	Proteína ativadora-1
ATF2	Activating transcription factor 2
BPA	Bisfenol A
CADD	Computer-aided Drug Design
CNNs	Current Neural Network
DA	Domínio de Aplicabilidade
DDE	Diclorodifenildicloroetano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEs	Desreguladores endócrinos
DEHP	Bis(2-etilhexil)ftalato
DL	Deep Learning
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNN	Deep Neural Network
DT	Decision Tree
ECOTOX	ECOTOXicology Knowledgebase
EDSP	Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos
EDSTAC	Comitê Consultivo de Triagem e Teste de Desreguladores Endócrinos
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial.
ECFP	Extended-Connectivity Fingerprints
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

ERDC	Centro de Desenvolvimento de Engenheiros do Exército dos Estados Unidos
EREs	Elementos de resposta ao estrogênio
FNN	Feedforward Neural Networks
GANs	Redes Neurais Generativas Adversariais
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G 1
GRU	Memória a curto prazo
HBA	Número de aceitadores de ligações de hidrogênio
HBD	Número de doadores de ligações de hidrogênio
HPG	Hipotálamo-hipófise-gonadal
hrER α	Proteína recombinante de ER α humano
HTS	High-throughput screening
IATA	Documento de Orientação para o Uso de Vias de Efeitos Adversos no Desenvolvimento de Abordagens Integradas para Teste e Avaliação
JRC	Centro Conjunto de Investigação da Comissão Europeia
KE	Key events
kNN	k-Nearest Neighbors
LBDD	Ligand-based Drug Discovery
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LogP	Coeficiente de partição octanol/água
LogS	Solubilidade estimada
LOO-CV	<i>Leave-One-Out Cross Validation</i>
LSTMs	Recorrentes longas de curto prazo
MCF-7	Células de câncer de mama humano
MIE	Molecular initiating event

ML	Machine Learning
MTX	Metoxicloro
mRNA	RNA mensageiro
MW	Peso Molecular
NCATS	Centro Nacional para o Avanço das Ciências Translacionais
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NTP	Programa Nacional de Toxicologia
NVS	NovaScreen HTS
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OT	Odyssey Thera
PAPP	Coefficientes de permeabilidade aparente
PCBS	Bifenilos policlorados
PCDFs	Dibenzofuranos policlorados
PCDDs	Dibenzo-p-dioxinas policloradas
PFOA	Ácido perfluorooctanóico
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 quinase
PPAR γ	Receptor de peroxissoma γ
PXR	Receptor pregnano X
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
RAs	Receptores de androgênio
RASV	Resposta androgênica seletiva
REs	Receptores de estrogênio
RF	Random Forest
RNA	Ácido ribonucleico

RNNs	Recurrent Neural Network
SAAOP	Society for the Advancement of AOPs
SBDD	Structure-based drug design
SDO	Síndrome da disgenesia ovariana
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
Sp-1	Proteína estimulante-1
SVM	Support Vector Machine
<i>t</i> -SNE	<i>t</i> -distributed stochastic neighbor embedding
TCDD	Tetraclorodibenzo-p-dioxina
Tox21	Toxicidade no Século XXI
ToxCast	EPA's Toxicity Forecaster
tPSA	Área de superfície de polaridade topológica

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 TOXICIDADE RELACIONADA AOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS	21
2.2 CLASSES DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS	24
2.4 VIAS DE EFEITOS ADVERSOS (AOPs).....	27
4.1.1 Receptores de Estrogênio.....	30
2.5.2 Receptores de Androgênio.....	34
2.5.3 Outros eventos moleculares de inicialização.....	38
2.6 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	39
2.6.1 Métodos <i>in vitro</i>	45
2.6.2 Métodos <i>in vivo</i>	47
2.7 RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE (QSAR) ..	47
2.7.1 Descritores Moleculares	49
2.7.2 Aprendizado de Máquina	50
2.7.3 Aprendizado Profundo.....	51
2.7.4 Aprendizagem Multitarefa	54
2.8 BOAS PRÁTICAS DE CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS QSAR..	55
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 METODOLOGIA COMPUTACIONAL	57
4.1.1 Coleta e preparo de dados.....	57
4.1.2 Análise de espaço químico	59
4.1.3 Modelos de camada 1	60

4.1.4 Modelo de camada 2.....	68
4.1.5 Domínio de aplicabilidade	70
4.1.6 Interpretação mecanística	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 PREPARO E PADRONIZAÇÃO DO CONJUNTO DE DADOS	72
5.1.1 Desregulação endócrina mediada por receptor de estrogênio	72
5.1.2 Desregulação endócrina mediada por receptor de androgênio.....	74
5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS.....	76
5.2.1 Análise de similaridade química.....	77
5.2.2 Mapa de correlação entre os dados	81
5.2.3 Propriedades físico-químicas dos conjuntos de dados	82
5.3 MODELO DE CAMADA 1	84
5.4 MODELO DE CAMADA 2.....	90
5.5 DOMÍNIO DE APLICABILIDADE	94
5.6 INTERPRETAÇÃO MECANÍSTICA	96
6 CONCLUSÃO	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

Os desreguladores endócrinos (DEs) são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como substâncias exógenas ou misturas cuja ação altera as funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, ocasiona efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, de sua progênie, de populações ou de subpopulações (VARTICOVSKI et al., 2022).

Uma das preocupações relacionadas aos DEs reside em sua ampla distribuição em diversos setores e na sua capacidade de contaminar o ambiente. Esses compostos são produzidos e aplicados em várias áreas, incluindo na agroindústria, como os agrotóxicos, e na indústria química, onde desempenham funções como plastificantes e retardadores de chamas. Além disso, são comumente encontrados em cosméticos e conservantes fabricados pela indústria farmacêutica, assim como em outras fontes naturais, como metabólitos de fungos e plantas (BALAGUER et al., 2017). Diante da extensa produção e uso, a exposição e a contaminação por esses compostos podem ocorrer por diferentes vias, incluindo a ingestão de água contaminada, a inalação de ar poluído, a ingestão de alimentos ou o contato com solos contaminados (BALAGUER et al., 2017; EGALINI et al., 2022).

Inicialmente, as evidências científicas estabeleceram as atividades dos DEs baseando-se em suas interações com receptores hormonais nucleares, como os receptores de estrogênio (RE), de androgênio (RA), de progesterona, de tireoide, de retinóides e também relacionadas aos mecanismos adjacentes (LI; CUI; WANG, 2023). Com o avanço científico, descobriu-se que os mecanismos de ação desses compostos são mais amplos e apresentam interações com receptores não nucleares. Além disso, também interagem com receptores não esteroides, receptores órfãos e vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e no metabolismo de esteroides (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Nesse cenário, a gama de contaminantes ambientais responsáveis por interferir no sistema endócrino é vasta. Entre as principais classes de DEs, podem-se citar: a) bisfenol A (BPA) e seus subprodutos; b) diclorodifeniltricloroetano (DDT); c) ftalatos; d) alquifeóis e demais substâncias empregadas nas indústrias têxteis (GORE et al., 2015; PIAZZA; URBANETZ, 2019).

Os DEs causam diversos efeitos adversos nos seres humanos, incluindo infertilidade, malformações genitais, cânceres e distúrbios metabólicos. A infertilidade, por exemplo, resulta da interferência de compostos como o BPA, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), metoxicloro (MTX) e ftalatos na foliculogênese, comprometendo a formação de folículos ovarianos (DUTTA et al., 2023; SOUTER et al., 2013). Além disso, estudos detectaram a presença de compostos químicos em embalagens plásticas de alimentos que afetam não apenas os RE e RA, mas também ativam o receptor pregnano X (PXR) e o receptor proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ) (STEVENS et al., 2024). Esses achados destacam a complexidade dos mecanismos de ação dos DEs e a variedade de seus efeitos na saúde humana. Os métodos tradicionais para identificar compostos com potencial de toxicidade química, baseados em testes experimentais *in vitro* e *in vivo*, apresentam desafios, como altos custos e demora na obtenção dos resultados (CIALLELLA; ZHU, 2019; ZHU et al., 2014).

Com os avanços recentes da inteligência artificial (IA), surgiram abordagens computacionais capazes de superar essas limitações, permitindo a predição de propriedades toxicológicas de forma mais eficiente e acessível (SINGH et al., 2024; JEONG; CHOI, 2022). Nesse contexto, as técnicas de IA representam abordagens custo-eficazes para predizer diferentes aspectos da toxicidade, incluindo toxicidade crônica, toxicidade aguda (LD₅₀), atividade em receptores hormonais e toxicidade em órgãos específicos (HU et al., 2023). A toxicologia computacional permite o uso de técnicas de subcampos da IA, como o aprendizado de máquina (ML, *Machine Learning*), e aproveita a crescente disponibilidade de bancos de dados para desenvolver modelos preditivos cada vez mais robustos (CAVASOTTO; SCARDINO, 2022). Diante desse avanço tecnológico, a aplicação dessas ferramentas tem se tornado essencial para avaliar riscos toxicológicos de substâncias químicas, incluindo aquelas classificadas como DEs.

2.1 TOXICIDADE RELACIONADA AOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A preocupação referente a substâncias químicas com potencial atividade de desregulação endócrina, tanto na saúde humana quanto no meio ambiente, aumentou nos últimos anos. Os DEs são capazes de alterar ou interferir no sistema hormonal, levando a efeitos adversos para os organismos, sua progênie, subpopulações ou populações (HO et al., 2022). Os DEs são produzidos em massa para recipientes de alimento, produtos de higiene pessoal e outros objetos plásticos e podem entrar no corpo humano através de ingestão de alimentos ou água contaminada, inalação e absorção dérmica (THE LANCET ONCOLOGY, 2021).

Os DEs podem ser sintéticos ou naturais, provenientes de múltiplas fontes, como industriais (produtos farmacêuticos, plásticos, retardantes de chama bromado e conservantes), agricultura e também em água contaminada. Alguns de seus representantes incluem BPA, ftalatos, parabenos, difenil éteres polibromados (PBDE), poluentes orgânicos persistentes (POPs), bifenilos policlorados (PCBs), entre outras substâncias (KUROWSKA et al., 2022; KASONGA et al., 2021).

Ao analisar os mecanismos de ação dos DEs, observa-se que muitos possuem propriedades esteroidais mistas, um único composto pode exercer tanto ação estrogênica quanto antiandrogênica ou apresentar propriedades relacionadas à progesterona (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Além disso, os metabólitos desses compostos podem apresentar atividades diferentes das moléculas originais. Um exemplo notável é o diclorodifeniltricloroetano (DDT), conhecido por sua atividade agonista de estrógeno, cujo metabólito diclorodifenildicloroetileno (DDE) atua como antagonista de androgênio (JAACKS et al., 2019). Os DEs são capazes de modular o metabolismo de hormônios endógenos, afetando tanto os cofatores dos receptores nucleares quanto a degradação de hormônios. Esses mecanismos abrangem diversas vias, incluindo as vias estrogênicas, androgênicas, tireoidianas, bem como as que envolvem o receptor ativado por PPAR- γ , receptores retinoides e outros receptores nucleares (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Dados clínicos e experimentais sugerem que os DEs impactam a saúde pré-natal e infantil, representam riscos para o sistema reprodutivo de homens e mulheres adultos, além de afetar a vida selvagem, como peixes e mamíferos (BALI et al., 2023; HASSAN et al., 2024; MARLATT et al., 2022; MÍNGUEZ-ALARCÓN et al., 2023). Aproximadamente 16% dos casais heterossexuais em idade reprodutiva enfrentam problemas de infertilidade, uma porcentagem que dobrou entre 1992 e 2012. Além das causas naturais, como mudanças no estilo de vida, dieta e reprodução em idades mais avançadas, os DEs estão entre os fatores que afetam o sistema reprodutor de homens e mulheres (MARLATT et al., 2022). Os DEs mais comuns são encontrados principalmente em plásticos, materiais de construção, produtos de combustão e agrotóxicos, sendo que alguns são produzidos pelo próprio organismo (BALI et al., 2023).

Estudos indicam que a exposição a ftalatos e a alteração na homeostase hormonal por meio de contaminação vertical pelo leite materno resultam em desenvolvimento incompleto. Por exemplo, foi relatada a presença de ftalato de monoetila no leite materno e sua relação com hormônio luteinizante livre em meninos de 3 anos de idade, sugerindo uma alteração na função testicular (MAIN et al., 2006). Achados recentes sugerem que a exposição ocupacional materna a ftalatos durante a gravidez está correlacionada com baixo volume de sêmen e diminuição da contagem de espermatozoides em seus filhos (ISTVAN et al., 2021). Outros efeitos observados na reprodução masculina incluem a exposição ao Bisfenol A, que tende a diminuir a concentração de espermatozoides (LI et al., 2011). Compostos antagonistas androgênicos, como agrotóxicos organoclorados (DDE, hexaclorobenzeno, clordanos, DDT), têm sido correlacionados a desordens como criptorquidia, hipospádia, câncer testicular e à redução dos níveis de testosterona e qualidade dos espermatozoides, caracterizando a síndrome da disgenesia testicular (HARDELL et al., 2003; MARLATT et al., 2022; SKAKKEBAEK; RAJPERT-DE MEYTS; MAIN, 2001).

Nas mulheres, a síndrome da disgenesia ovariana (SDO) propõe que problemas na saúde reprodutiva feminina, como redução da fertilidade, endometriose, insuficiência ovariana primária e síndrome do ovário policístico (SOP), podem estar relacionados à exposição a DEs (JOHANSSON et al., 2017). Estudos correlacionam

a presença de BPA com maior risco de aborto espontâneo, além de associação dos contaminantes endócrinos com o aumento de SOP (LATHI et al., 2014; HU et al., 2018). Outros DEs, como compostos organoclorados (dioxinas, bifenilas policloradas), também estão associados ao diagnóstico de endometriose e SOP em estudos experimentais com animais (CANO-SANCHO et al., 2019; PAN et al., 2019).

Os efeitos dos desreguladores vão além dos órgãos reprodutivos. Eles podem se estender para efeitos que atingem a função da tireoide, paratireoide, hipófise, adrenal e outros. Os hormônios da tireoide são importantes para o desenvolvimento e metabolismo em vertebrados adultos. Os efeitos dos DEs que atingem a tireoide interferem no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e levam à alteração na síntese, liberação, transporte, metabolismo e ação desses hormônios nos tecidos-alvos (GUARNOTTA et al., 2022). Os percloratos, por exemplo, podem afetar significativamente a ação do hormônio tireoidiano no desenvolvimento do recém-nascido (GINSBERG et al., 2007).

Além disso, existem evidências que sugerem que a glândula paratireoide seja um alvo para a ação dos DEs. Painéis testados em tumores da paratireoide em humanos, verificou-se que PCBs, PBDEs e derivados do DDT tiveram associações relacionadas ao crescimento do tumor e negativamente correlacionados com o cálcio sérico dos pacientes (HU et al., 2021; GUARNOTTA et al., 2022).

A glândula adrenal apresenta-se altamente sensível aos DEs devido às suas características bioquímicas específicas, como alta vascularização, alta lipofilicidade e a presença de enzimas do citocromo P450 que produzem radicais livres e compostos reativos (HARVEY, 2016). Alguns estudos mostraram que os DEs induzem toxicidade adrenocortical ao estimular ou inibir enzimas das vias de esteroidogênese, sendo os inibitórios o etomidato, cetoconazol, nitrofurano e outros, enquanto os estimuladores incluem PCB126, chumbo, herbicidas 2-cloro-s-triazina e outros (GUARNOTTA et al., 2022).

Assim, a exposição aos DEs representa sérios riscos à saúde reprodutiva de humanos e vida selvagem, conforme evidenciado por estudos epidemiológicos e experimentais.

2.2 CLASSES DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os DEs podem ser classificados em múltiplas categorias, conforme a estrutura dos compostos. Entretanto, eles são comumente classificados como compostos persistentes e não persistentes. Os compostos não persistentes são assim classificados devido às características de meia-vida em um curto período de tempo e o metabolismo rápido dos compostos. Incluem-se nessa classe os fenóis, parabenos, ftalatos e também os pesticidas organofosforados. Além disso, esses compostos podem ser encontrados em produtos comerciais como protetores solares e plastificantes (BALI et al., 2023; ERCAN; TARCIN, 2022).

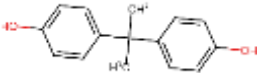
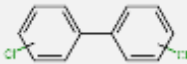
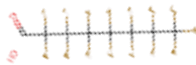
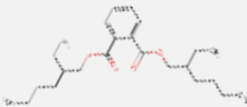
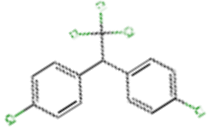
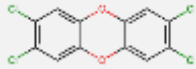
A respeito dos compostos classificados como persistentes, eles apresentam a característica de acumular-se nos organismos devido à sua alta persistência ambiental e sua incapacidade de serem facilmente metabolizados (ERCAN; TARCIN, 2022). Esses compostos podem ser transferidos de um organismo para outro, interferindo na cadeia alimentar e aumentando suas concentrações em diferentes indivíduos e espécies, resultando em efeitos adversos substanciais. Entre os compostos que se enquadram nesta categoria estão os bifenilos policlorados (PCBs), sulfonato de perfluorotano e seu sal (PFAS) e éteres difenil polibromados (PBDEs) (BALI et al., 2023; IDOWU et al., 2023; MOKRA, 2021; PETTOELLO-MANTOVANI et al., 2021).

O BPA é um composto aromático precursor para alguns plásticos e aditivos químicos. Esse composto apresenta mais de uma via de exposição para os organismos, cujo o principal é a via oral uma vez que seja utilizado durante a produção de plásticos de policarbonato, em recipientes de alimentos e resinas epóxi que são utilizados na maioria das latas de alimentos e bebidas (BALI et al., 2023). Essa substância se configura como um xenobiótico com atividade estrogênica, por tal característica o BPA pode interferir no sistema de controle de feedback do organismo, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), especificamente no que se refere às alterações dos níveis do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e através de uma cascata química leva a efeitos adversos no sistema reprodutivo (MA et al., 2019; SILVA et al., 2023).

Os ftalatos também se configuram como substâncias utilizadas na produção de plásticos. Esses compostos possuem como função na indústria de plásticos, principalmente na síntese de cloretos de polivinilas, de deixá-los mais maleáveis, transparentes e duradouros. Sua atividade como DE de interferir na biossíntese, no metabolismo e também na atividade hormonal dos organismos (SILVA et al., 2023). Uma das preocupações desses compostos para o ambiente se configura no fato de os ftalatos lixiviarem dos produtos e contaminarem alimentos, água, solo e ar, uma vez que eles não se ligam covalentemente à estrutura. Esses compostos já foram encontrados em órgãos, tecidos e fluidos corporais como fígado, pulmão, tecido adiposo, urina, líquido folicular ovariano e também amniótico (PANAGIOTOU; OJASALO; DAMDIMOPOULOU, 2021).

A classe das dioxinas abrange cerca de 210 compostos clorados que são subdivididos em dois grupos: i) dibenzofuranos policlorados (PCDFs); ii) dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs). Esses compostos apresentam em suas estruturas átomos de cloro nos carbonos 2, 3, 7 e 8 essenciais para resistência frente à degradação metabólica, o que leva a um acúmulo corporal e também pela classificação como DE persistente. A principal fonte de dioxinas são por processos de combustão (SILVA et al., 2023). A Tabela 1, adaptada de Silva et al. (2023), apresenta alguns dos DEs mais conhecidos por seus efeitos negativos na infertilidade (SILVA et al., 2023). Além disso, explora o tempo de persistência dos compostos no ambiente, evidenciando seus respectivos tempos de meia-vida. Alguns compostos apresentam baixo tempo de meia-vida no ambiente, como BPA e o DEHP (CHAPON; BRIGNON; GASPERI, 2023; SHEHAB; JAMIL; ARIS, 2020). Outros compostos apresentam características de persistência no solo e água mais elevada, como os PCBS e PFAS (BEYER; BIZIUK, 2009; TERZAGHI et al., 2021; COUSINS et al., 2020). A depender da condição do solo, o DDT tem a meia-vida de 7 meses a 15 anos (VAN DEN BERG, 2011). Já a hidrólise do DEHP na superfície de água pode demorar mais de 100 anos (WAMS, 1987).

Tabela 1: Classificação, propriedades e principais desreguladores endócrinos.

Composto	Estrutura	Classe	Via de exposição	Fonte	Persistência Ambiental (Meia-vida)
BPA		Bisfenóis	Ingestão, inalação e tópica.	Plásticos de policarbonato, papel térmico, resinas, brinquedos, garrafas plásticas e revestimento de latas.	Baixa (4 – 5 horas)
PCBs		Bifenilos policlorados	Ingestão, inalação e tópica.	Produção de tintas, pigmentos e resíduos elétricos	Alta (1,3 – 5,6 anos)
PFOA		Ácido perfluoroalcano sulfônico	Ingestão, inalação e tópica.	Impermeabilizantes, coloração de roupas, estofados e tapetes	Alta (3,8 anos)
DEHP		Ftalato	Ingestão, inalação e tópica.	Dispositivos médicos	Baixa (2-4 semanas)
DDT		Organoclorado	Ingestão, inalação e tópica.	Água contaminada, solo e peixes	Alta (2-15 anos)
TCDD		Dioxina	Ingestão e inalação.	Combustão de combustíveis fósseis, processos de incineração	Alta (9-15 anos)

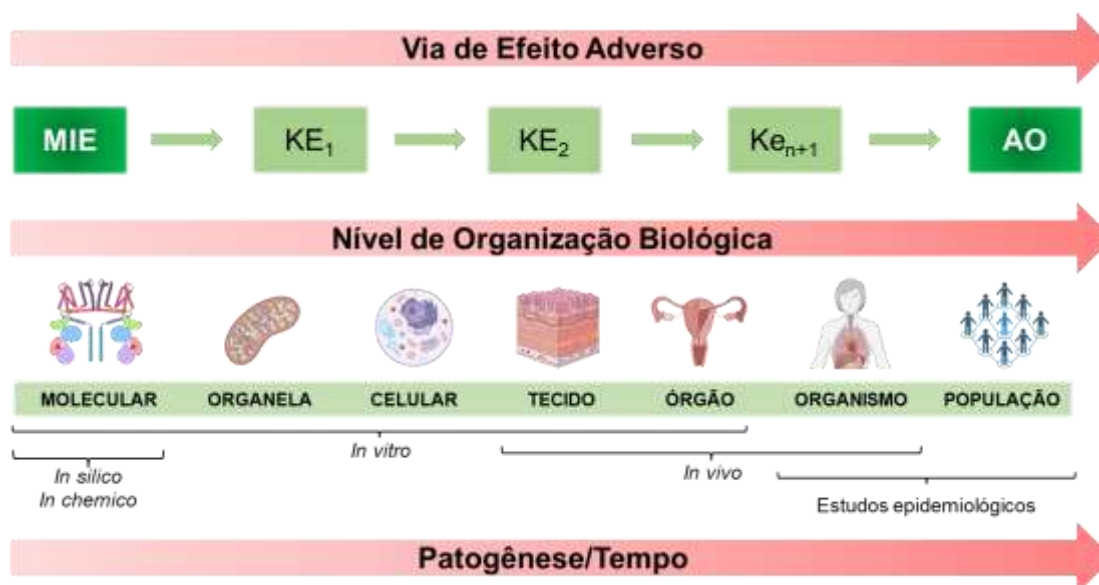
BPA: Bisfenol A; DEHP: bis(2-etilhexil)ftalato; DDT: diclorodifeniltricloroetano; PCBs: bifenilos policlorados; PFOA: ácido perfluorooctanóico; TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina. Fonte: (SILVA et al., 2023).

2.4 VIAS DE EFEITOS ADVERSOS (AOPs)

As vias de efeitos adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) são ferramentas novas que oferecem novas oportunidades para facilitar o conhecimento mecanístico para propósitos regulatórios na toxicologia e ecotoxicologia. Uma AOP pode ser caracterizada como uma sequência de eventos da qual se inicia com um evento de inicialização molecular (MIE, *molecular initiating event*), como, por exemplo, inibição enzimática, ligação a receptor ou alteração de DNA. Após o MIE, a sequência progride através de uma série de eventos-chaves (KE, *key events*) que podem ser modificações em organelas ou funções celulares até resultar em um determinado desfecho adverso (AO, *adverse outcome*) (LEIST et al., 2017).

De acordo com o Documento de Orientação para o Uso de Vias de Efeitos Adversos no Desenvolvimento de Abordagens Integradas para Teste e Avaliação (IATA) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), cada AOP deve conter um MIE e um AO, mas não há limitações quanto ao número de KEs (LEIST et al., 2017; OECD, 2017). Nesse contexto, uma única AOP pode conter múltiplos KEs ligados à exposição a compostos DEs e afetar diferentes níveis de organização biológica, como evidenciado na Figura 1.

Figura 1: Esquema de sequência de eventos chaves ligadas a um evento de inicialização molecular até um desfecho adverso através de diferentes níveis de organização biológica.



Adaptado de OECD, 2017.

Embora as estruturas tenham características similares, existem diferenças importantes quanto às AOPs e as vias de sinalização. Uma dessas diferenças refere-se à: uma via de sinalização clássica começa pelo sinal inicial e, então, leva a uma cascata para atingir múltiplos alvos. Por exemplo, o receptor de hidrocarboneto arílico é um alvo inicial de algum composto e leva a múltiplas consequências possíveis. Já a intenção dos AOPs é examinar cada KE em relação à sua relevância e necessidade para o desfecho final, AO, vinculando KEs anteriores de um AOP ao AO, mesmo que o ponto de partida ou alguns KEs intermediários não sejam completamente compreendidos (LEIST et al., 2017).

Para incentivar o desenvolvimento e a integração de AOP entre os cientistas, a OECD em colaboração com o Centro Conjunto de Investigação da Comissão Europeia (JRC), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e o Centro e Desenvolvimento de Engenheiros do Exército dos Estados Unidos (ERDC) estabeleceram a base de dados de AOP online, denominada AOP-KB, que proporciona aos cientistas a construção e documentação de AOPs, inserindo e fornecendo informações sobre MIEs, KEs, AOs e a evidência biológica e empírica que apoiam as ligações causais e/ou preditivas (KNAPEN et al., 2015).

O desenvolvimento das AOPs está sob supervisão da OECD com o Grupo Consultivo sobre Avaliação de Ciência Emergente em Produtos Químicos (ESCA) colaborando com a Sociedade para o Avanço de AOPs (SAAOP, *Society for the Advancement of AOPs*) e o Grupo de Coordenação da Base de Conhecimento AOP. Eles auxiliam no endossamento das AOPs desenvolvidas através de revisões técnicas de acordo com processos descritos no Manual dos Desenvolvedores de AOP e juntamente com outros grupos (ZILLIACUS et al., 2024). Com o objetivo de aproveitar os potenciais das AOPs nas aplicações práticas de identificação e avaliação de DEs, faz-se necessário o uso de redes AOP mais complexas e interconectadas (KNAPEN et al., 2018).

No campo das pesquisas químicas, o uso das AOPs oferece uma vantagem significativa ao fornecer uma estrutura conceitual e uma abordagem lógica para relacionar os efeitos adversos de um composto aos níveis moleculares, de órgãos ou de organismos (CHAUHAN et al., 2021; WU et al., 2022). Modelos de aprendizado de máquina podem ser aplicados como ferramentas que respeitam as estruturas já

estabelecidas pelas AOPs. Isso beneficia a área toxicológica ao proporcionar uma visão abrangente dos processos biológicos, cobrindo toda a sequência de eventos envolvidos na toxicidade. Além disso, essa abordagem oferece informações suplementares aos métodos tradicionais baseados em hipóteses (por exemplo, ensaios em animais e modelos baseados em células *in vitro*), bem como fornecer informações de amostras de poluentes suficientes para predição de novos poluentes na toxicologia ambiental (WU et al., 2022).

Nos Estados Unidos, a EPA se baseou nas recomendações do Comitê Consultivo de Triagem e Teste de Desreguladores Endócrinos (EDSTAC) para o desenvolvimento de uma abordagem dividida em dois níveis que implementa um programa de triagem relacionado à desregulação endócrina, denominado como Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos (EDSP). O comitê recomendou expandir o EDSP para avaliar os efeitos químicos nas vias androgênicas, tireoidianas e estrogênicas relacionados à vida selvagem e nos seres humanos em dois níveis/camadas (BROWNE et al., 2017). A camada 1 aborda bioensaios desenhados a fim de identificar substâncias químicas que apresentem interações com os sistemas estrogênicos, androgênicos e tireoidiano. Já a camada 2 aborda a etapa para determinar se a substância química realmente interfere nos processos relacionados com o sistema endócrino e estabelecer relações de dose. Para produtos químicos que tenham potencial atividade endócrina, podem ser solicitados quatro testes de Nível 2 de longo prazo realizados em mamíferos, peixes, anfíbios e aves para caracterizar as relações dose-resposta e os efeitos adversos (BROWNE et al., 2017; CLODE, 2006).

Uma abordagem que tem sido amplamente utilizada na área da toxicologia é a triagem de alto rendimento (HTS, *high-throughput screening*) (CIALLELLA et al., 2021). Nesse sentido, a iniciativa do programa ToxCast (*US EPA Toxicity Forecaster*) surgiu com os dados públicos do HTS e progrediu para a iniciativa colaborativa Toxicidade no Século XXI (Tox21) entre a EPA, Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*), Centro Nacional para o Avanço das Ciências Translacionais (NCATS) e o Programa Nacional de Toxicologia (NTP) (DIX et al., 2007; RICHARD et al., 2021).

Partindo para a perspectiva da toxicidade associada aos DEs, foram desenvolvidos modelos matemáticos que utilizem dados de 16 bioensaios obtidos do

HTS através do ToxCast e Tox21 que medem os KEs de uma AOP iniciada pela ativação do receptor alfa de estrogênio (BROWNE et al., 2018; JUDSON et al., 2015; KLEINSTREUER et al., 2016). Estes modelos utilizam os ensaios uterotróficos *in vivo* de roedores como AO e seus resultados foram aceitos pela EPA em 2015 como substitutos da bateria de testes Nível 1 da EDSP para triagem de compostos com atividades estrogênicas (CIALLELLA et al., 2021).

Alguns autores utilizaram a abordagem de dois níveis para construção de modelos de aprendizado de máquina de classificação para desregulação endócrina. Onde a camada 1 se baseou na construção de modelos de classificação binária com os bioensaios *in vitro* de androgênio e estrogênio. Quanto ao nível dois se baseou na predição dos modelos consensos gerados na primeira etapa baseado nos modelos de AOP para toxicidade reprodutiva humana (TAN et al., 2022). A seguir elencamos em detalhes as vias de efeito adverso mais conhecidas para a desregulação endócrina humana.

4.1.1 Receptores de Estrogênio

O RE foi o primeiro receptor relacionado ao hormônio encontrado, por meio de pesquisas de Elwood Jensen em 1958, ao evidenciar que os tecidos reprodutivos absorviam estrogênio ao se ligarem a proteínas. Vinte anos após a descoberta, o primeiro receptor de estrogênio, RE α , foi clonado utilizando o RNA da linhagem de células de câncer de mama humano MCF-7 (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Dez anos depois, Gustafsson *et al.* (1996) descreveram o segundo receptor de estrogênio, RE β , expresso principalmente nas células epiteliais secretoras da próstata e nas células granulosas do ovário, que compartilhava um alto grau de homologia com o RE α (KUIPER et al., 1996; PAECH et al., 1997).

Os receptores de estrogênio, RE α e RE β , pertencem à superfamília dos receptores hormonais nucleares que atuam como reguladores da transcrição (SCHWABE; TEICHMANN, 2004). Eles possuem quatro domínios funcionais principais ao longo de sua estrutura: A/B, C, D e E/F. A região A/B, localizada no terminal amino, é envolvida na transativação da transcrição gênica. A região C está relacionada ao sítio de ligação ao DNA, contribuindo para a dimerização do RE e a ligação a sequências específicas na cromatina, conhecidas como elementos de

resposta ao estrogênio (EREs) (FUENTES; SILVEYRA, 2019; SCHEIDEREIT et al., 1986; TRUSS; BEATO, 1993). O domínio D conecta as regiões C e E e é capaz de se ligar a proteínas chaperonas. Essa região também contém um sinal de localização nuclear, permitindo que os complexos receptor-ligante se transloquem para o núcleo. A região E/F é responsável pelo sítio de ligação ao ligante (estrogênio), além de conter locais de ligação para coativadores e correpressores (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

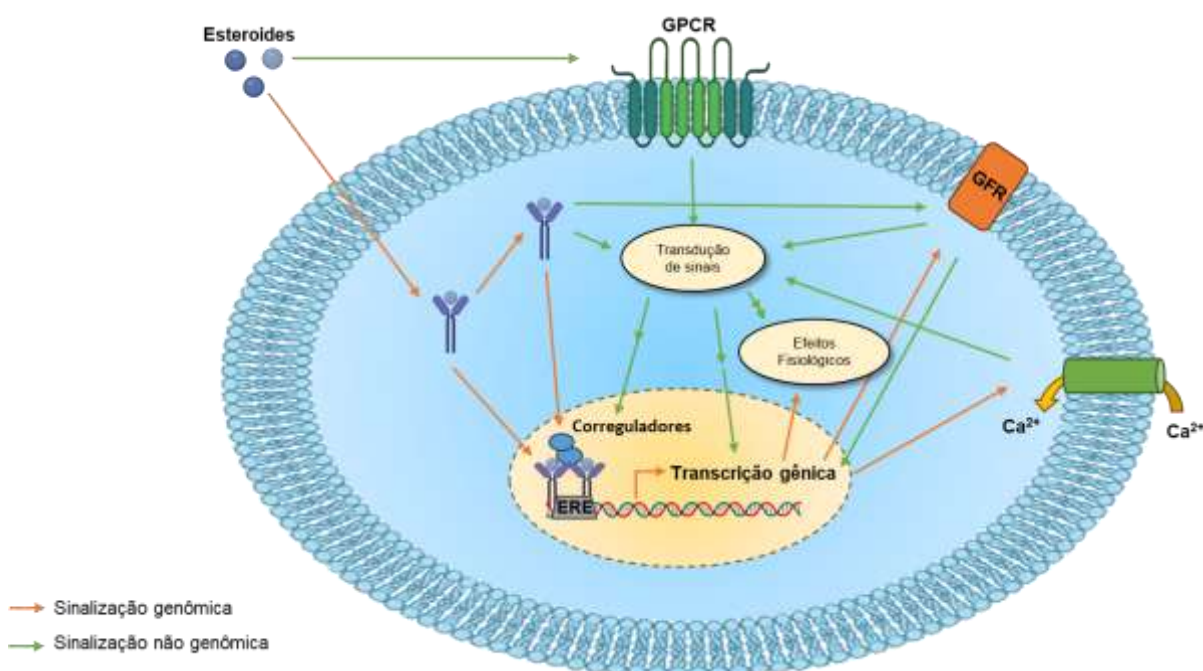
A capacidade do estrogênio em atravessar a membrana plasmática e interagir com os receptores intracelulares RE α e RE β interfere diretamente na expressão gênica ao se ligar a sequências específicas de DNA. Além disso, o ligante pode ativar cascatas de sinalização intracelular por meio da interação com o RE acoplado à proteína G 1 (GPCR) e/ou RE α e RE β . Esses eventos de sinalização mediados pelo estrogênio são categorizados como genômicos e não genômicos conforme Figura 2. Os efeitos genômicos ocorrem quando os complexos estrogênio-receptor se translocam para o núcleo e interagem diretamente com a cromatina em sequências específicas de DNA conhecidas como EREs. Em contraste, os efeitos não genômicos envolvem a regulação indireta da expressão gênica através de uma variedade de eventos de sinalização intracelular (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Conforme as vias de sinalização, a sinalização genômica direta é dita como o mecanismo clássico de sinalização do estrogênio. Tanto os receptores RE α quanto RE β atuam como fatores de transcrição ativados por ligante. Após a ligação do estradiol ao RE α e RE β no citoplasma, ocorre uma mudança conformacional que induz à dimerização do receptor. Esse complexo então migra para o núcleo, onde se liga à cromatina nas sequências ERE, regiões potenciadoras dentro ou perto dos promotores dos genes alvos como mostrado na Figura 2 (O'LONE et al., 2004).

A transcrição de vários genes pode ser regulada pelo estradiol mesmo na ausência dos EREs, que envolve a sinalização genômica indireta. Esses mecanismos são baseados na ativação da expressão gênica por receptores de estrogênio que não se ligam diretamente ao DNA. Em vez disso, os complexos de receptores de estrogênio agem por meio de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição e elementos de resposta. Entre os mediadores da sinalização genômica indireta estão a proteína estimulante-1 (Sp-1) e o ATF2 (*Activating transcription factor 2*). O primeiro induz genes como os receptores de lipoproteína de baixa densidade,

receptor de progesterona B, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), proteína de ligação GATA 1 (GATA1) e entre outros (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005; CHAMBLISS; SHAUL, 2002; FUENTES; SILVEYRA, 2019; O'LONE et al., 2004).

Figura 2: Mecanismos de respostas genômicas e não genômicas mediadas pela sinalização de hormônios de esteroides.



Adaptado de (WILKENFELD; LIN; FRIGO, 2018).

A via de sinalização indireta não genômica envolve ativação de mecanismos de transdução de sinal com a subsequente produção de segundos mensageiros intracelulares, regulação de AMPc e ativação de proteína-quinase de cascatas de sinalização que resultam em mudanças indiretas na expressão gênica. Essa via se dá através de quatro vias: 1) fosfolipase C; 2) cascata Ras/Raf/MAPK; 3) cascata da fosfatidil Inositol 3 quinase (PI3K); e a 4) via de sinalização do AMPc. A fosforilação dos fatores de transcrição através das quinases citadas podem interferir na função e capacidade de se ligar a sequências genômicas para afetar a expressão gênica (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Como dito anteriormente, embora as AOPs e as vias de sinalização sejam semelhantes, elas apresentam diferenças significativas relacionadas aos objetos de estudo e a finalidade de cada um deles. As vias de efeito adverso mediada pelos

receptores de estrogênio envolvem 7 etapas. A primeira dela consiste na ligação da molécula ao receptor como efeito de inicialização molecular. Após isso, os eventos chave envolvem a dimerização do receptor, ligação a cromatina, atividade do fator de transcrição, expressão gênica e, por fim, a proliferação celular. Para verificar o AO dessa via, pode-se realizar estudos para avaliar, como, por exemplo, o aumento do peso uterino através de bioensaios conhecidos como uterotróficos (TAN et al., 2022).

Figura 3: Esquema das vias adversas relacionadas ao receptor de estrogênio baseado nos ensaios presentes nos programas ToxCast e Tox21.



Fonte: autoria própria.

Os ensaios *in vitro* evidenciados na Tabela 2 e Figura 3 foram selecionados com o intuito de maximizar a cobertura da AOPs do RE. Os ensaios do ToxCast foram obtidos da triagem de alto rendimento com ensaios de atividade para múltiplos *endpoints* relacionados à toxicidade de DEs sobre REs (CIALLELLA et al., 2021; JUDSON et al., 2015; ROTROFF et al., 2014).

O ensaio de ligação ao receptor NovaScreen HTS (NVS) é testado para receptores de estrogênio de humanos (NVS_hER), bovinos (NVS_bER) e murinos (NVS_mERa). As amostras utilizadas para os ensaios foram conduzidas em extratos de células de câncer de mama responsivas a estrogênio MCF-7, extratos de membranas uterinas de bovinos e o domínio de ligação do ligante no REα recombinante de camundongos, respectivamente. Os ensaios de Odyssey Thera (OT) utilizam a plataforma ensaio de complementação proteína-fragmento que consiste em uma proteína repórter amarelo fluorescente dissecada em dois fragmentos e fundida a duas proteínas conhecidas para interagir com a sinalização complexa expressa em

linhagens de células renais humanas HEK293T. Os ensaios foram realizados em três condições de dimerização ($ER\alpha ER\alpha$, $ER\alpha ER\beta$, $ER\beta ER\beta$) e representam ensaios, OT_ERaERa_1440, OT_ERaERb_1440, OT_ERbERb_1440, respectivamente. Já os ensaios de Attagene RE descrevem uma vasta coleção de ensaios de fatores de transcrição, incluindo dois ensaios de RE (ATG_ERa_TRANS e ATG_ERE_CIS) (JUDSON et al., 2015; ROTROFF et al., 2014).

2.5.2 Receptores de Androgênio

O RA desempenha múltiplas funções nas características sexuais e no desenvolvimento do sistema reprodutor ao se ligar aos hormônios andrógenos (GRINO; GRIFFIN; WILSON, 1990). Uma vez que seja um receptor nuclear de hormônios, cujo gene se localiza no cromossomo X, sua expressão ocorre em diferentes tipos de tecidos, como nos ossos, músculos, próstata, tecido adiposo e nos sistemas reprodutivo, cardiovascular, imunológicos, neurais e hematopoiético (RANA; DAVEY; ZAJAC, 2014).

O RA possui em sua estrutura três domínios principais: o de ligação à molécula, de ligação ao DNA e o domínio de regulação transcricional N-terminal (MACLEAN; WARNE; ZAJAC, 1997). Ao observar que o domínio de ligação ao DNA é altamente conservado entre a família de receptores de esteroides, denota-se que a ligação de elementos de resposta androgênica seletiva permite a ativação específica do RA. Os mecanismos de ação do RA dependentes de ligante podem ser dividido em dois: a) dependente da ligação ao DNA, também chamada de genômica ou clássica; e b) não dependente da ligação ao DNA, conhecida como não genômica (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

No caso da via clássica, o RA é citoplasmático, associado a proteínas choque térmico (HSPs) e outras proteínas chaperonas. Nesse caso, o ligante conecta-se ao receptor, o que ocasiona uma mudança conformacional da proteína e consequente dissociação das proteínas chaperonas. Por sua vez, isso expõe um sinal de localização nuclear (SLN) responsável pela importação do receptor para o núcleo. O complexo então se transloca em direção ao núcleo da célula, onde ocorre a dimerização e ligação aos elementos de resposta androgênica seletiva (ERAs) dentro dos genes-alvo para modular a transcrição gênica (EDER et al., 2001). A atividade

transcricional do RA ligado aos andrógenos é modulada por proteínas específicas conhecidas como corre reguladores que aumentam ou diminuem a capacidade de ativar o gene-alvo ao remodelar a cromatina e modificar as histonas (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

Algumas linhagens celulares evidenciaram a ativação de mensageiros como o ERK, Akt e MAPK, nas vias que não dependem da ligação do complexo ligante-receptor de andrógeno ao DNA. A transrepressão indireta do gene ocorre por meio da ligação do RA e pelo sequestro de fatores de transcrição, como a proteína ativadora-1 (AP-1), que normalmente são necessários para regular positivamente a expressão do gene-alvo, mesmo na ausência da ligação do RA ao DNA (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

Figura 4: Esquema das vias adversas relacionadas ao receptor de andrógeno baseado nos ensaios presentes nos programas ToxCast e Tox21.



Fonte: autoria própria.

Como ilustrado na Figura 4, foi construído um modelo computacional de vias responsivas ao RA dos programas do ToxCast e Tox21 similar ao método de estrogênio utilizando os resultados dos ensaios *in vivo* de *Hershberger* como AO (BROWNE et al., 2018; JUDSON et al., 2020).

Tabela 2: Ensaios *in vitro* utilizados para avaliar a Via de Efeito Adverso do receptor de estrógeno com base no ToxCast e Tox21.

Ensaio	Fonte	Tempo (min)	Processo Biológico Alvo	Descrição do Ensaio	Linhagem Celular	Organismo
NVS_NR_hER	NovaScreen	1080	Ligação ao receptor	Ligação radioligante	Livre	Humano
NVS_NR_mERA	NovaScreen	1080	Ligação ao receptor	Ligação radioligante	Livre	Camundongo
NVS_NR_bER	NovaScreen	1080	Ligação ao receptor	Ligação radioligante	Livre	Bovino
OT_ER_ERaERa_0480	Odyssey Thera	480	Dimerização do receptor	Complementação de fragmentos de proteínas	Célula HEK293T	Humano
OT_ER_ERaERa_1440	Odyssey Thera	1440	Dimerização do receptor	Complementação de fragmentos de proteínas	Célula HEK293T	Humano
OT_ER_ERaERb_0480	Odyssey Thera	480	Dimerização do receptor	Complementação de fragmentos de proteínas	Célula HEK293T	Humano
OT_ER_ERaERb_1440	Odyssey Thera	1440	Dimerização do receptor	Complementação de fragmentos de proteínas	Célula HEK293T	Humano
OT_ER_ERbERb_0480	Odyssey Thera	480	Dimerização do receptor	Complementação de fragmentos de proteínas	Célula HEK293T	Humano
OT_ER_ERbERb_1440	Odyssey Thera	1440	Dimerização do receptor	Complementação de fragmentos de proteínas	Célula HEK293T	Humano

OT_ERa_EREFP_0120	Odyssey Thera	120	Regulação da Ligação do DNA ao ERE	Indução de Proteína Fluorescente	Célula HeLa	Humano
OT_ERa_EREFP_0480	Odyssey Thera	480	Regulação da Ligação do DNA ao ERE	Indução de Proteína Fluorescente	Célula HeLa	Humano
ATG_ERa_TRANS	Attagene, Inc.	1440	Atividade sobre o fator de transcrição	Indução de mRNA	Célula HepG2	Humano
ATG_ERE_CIS	Attagene, Inc	1440	Atividade sobre o fator de transcrição	Indução de mRNA	Célula HepG2	Humano
Tox21_ERa_BLA_BG1_Agonist	Tox21	1440	Atividade sobre o fator de transcrição	Indução β -lactamase	Célula HEK293T	Humano
Tox21_ERa_LUC_BG1_Agonist	Tox21	1320	Atividade sobre o fator de transcrição	Indução luciferase	Célula VM7	Humano
Tox21_ERa_BLA_Antagonist	Tox21	1440	Atividade sobre o fator de transcrição	Indução β -lactamase	HEK293T	Humano
ACEA_ER_80hr	ACEA Biosciences, Inc	1920	Proliferação celular	Cinética de crescimento celular	Célula T47D	Humano

Fonte: (JUDSON et al., 2020)

A via de efeito adverso começa com a ligação do agonista ao receptor ao qual eles enumeraram em nós, sendo esse o nó MIE. Após isso, ocorrerá a dimerização do receptor e translocação para o recrutamento de corretores (KE₁) para formar o complexo completo e ativo do fator de transcrição. Uma vez que a translocação esteja completa, o complexo se ligará ao DNA da cromatina nas sequências de ERAS (KE₂) e iniciará a transcrição do mRNA (KE₂, KE₃) e subsequente tradução em proteína (KE₄) (KLEINSTREUER et al., 2017).

Alternativamente a via antagonista envolve praticamente as mesmas etapas. Um antagonista liga-se ao receptor no evento de inicialização (MIE), ocorre então a dimerização e recrutamento dos corretores, formando o complexo que se liga aos EREs da cromatina do DNA. A diferença em relação à via agonista é que a sequência de EREs é transcricionalmente inativa resultando na falta de produção de proteínas e consequente redução na proliferação celular (KE₅). Cada uma dessas etapas, tanto das vias agonistas quanto das antagonistas, foram avaliadas em ensaios *in vitro*. Para descrever o efeito adverso da via foi selecionado o ensaio em roedores, *Hershberger*, que avalia a mudança de peso de 5 tecidos sexuais dependentes de andrógenos (BROWNE et al., 2018; KLEINSTREUER et al., 2017; TAN et al., 2022).

Na avaliação dos efeitos adversos relacionados ao RA, diversos ensaios *in vitro* têm sido utilizados para caracterizar a interação de substâncias químicas com esse receptor. As plataformas ToxCast e Tox21 oferecem um conjunto abrangente de dados experimentais que permitem investigar tanto os efeitos agonistas quanto antagonistas no RA. Esses ensaios, mencionados na Tabela 3, são fundamentais para entender os mecanismos moleculares envolvidos na disfunção endócrina mediada pelo RA, permitindo identificar potenciais riscos à saúde associados à exposição a compostos químicos.

2.5.3 Outros eventos moleculares de inicialização

A estrutura de AOP é útil para organizar o conhecimento existente e providenciar uma perspectiva de via de diferentes modos da desregulação endócrina pelos contaminantes (RAVICHANDRAN; KARTHIKEYAN; SAMAL, 2022).

As vias mecanicistas que desencadeiam eventos relacionados ao DE ainda são desafios a serem esclarecidos. No entanto, a partir da estrutura conceitual da OECD para teste e avaliação dos DEs, alguns dos MIEs presentes nessa estrutura estão relacionadas às isoformas do RE, RA, inibição da tireoperoxidase/ligação da transtirretina, receptor de glicocorticoide, receptor da vitamina D3, receptor de retinóide X e outros como *endpoints in vivo* a serem avaliados (LUPU et al., 2020; SAPOUNIDOU; NORINDER; ANDERSSON, 2022). Nessa perspectiva, Saponidou, Norinder e Andersson (2023) desenvolveram estudos que utilizassem modelos matemáticos para predição *in silico* para atividade endócrina utilizando 14 receptores e aplicaram os modelos em uma triagem de 55 mil compostos com potencial risco para exposição humana.

Outro estudo envolvendo AOP de destaque para a área ecotoxicológica foi desenvolvido por Villeneuve et al. (2016). A base dessa AOP se concentra em avaliar a capacidade de indução de disfunção reprodutiva através da inibição da aromatase em peixes (OECD, 2017; RODRIGUEZ et al., 2023). Essa AOP foi licenciada sob a licença BY-AS e depositada no AOP Wiki 25 e se trata de um ensaio que avalia a enzima aromatase, ao qual pertence ao sistema do Citocromo P450, cuja ação se dá em converter hormônios andrógenos em estrógenos (VILLENEUVE et al., 2023). A AOP tem como seu MIE a inibição da enzima e seus KEs podem ser medidos *in vitro* e *in vivo* através de células cultivadas expostas aos compostos e consideram: a) o nível de 17 β -estradiol no plasma de peixes fêmeas; b) diminuição ou acúmulo da síntese de vitelogenina no fígado de peixes fêmeas; c) redução da síntese de 17 β -estradiol por células do ovário e entre outros (ALLEN et al., 2016; CONOLLY et al., 2017).

2.6 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A Comissão Europeia publicou em 2023 o Regulamento Delegado (EU) 2023/707. Este regulamento altera o Regulamento CLP e inclui novos critérios de classificação para substâncias e misturas químicas que interferem no sistema endócrino. As duas categorias para os DEs estabelecidos são: 1) DEs conhecidos ou presumidos, e 2) DEs suspeitos.

Tabela 3: Ensaios *in vitro* utilizados para avaliar a Via de Efeito Adverso do receptor de andrógeno com base no ToxCast e Tox21.

Ensaio	Fonte	Gene	Espécie	Tipo
NVS_NR_hAR	Novascreen	RA	<i>Homo sapiens</i>	Ligação ao receptor
NVS_NR_cAR	Novascreen	RA	<i>P. troglodytes</i>	Ligação ao receptor
NVS_NR_rAR	Novascreen	RA; SRC	<i>Rattus norvegicus</i>	Ligação ao receptor
OT_AR_ARSRC1_0480	Odyssey Thera	RA; SRC	<i>Homo sapiens</i>	Recrutamento de correguladores
OT_AR_ARSRC1_0960	Odyssey Thera	RA; SRC	<i>Homo sapiens</i>	Recrutamento de correguladores
ATG_AR_TRANS_up	Attagene	RA; ERAs	<i>Homo sapiens</i>	RNA repórter genético
ATG_AR_TRANS_dn	Attagene	RA; ERAs	<i>Homo sapiens</i>	RNA repórter genético
OT_AR_ARELUC_AG_1440	Odyssey Thera	RA; ERAs	<i>Homo sapiens</i>	Reporter genético
Tox21_AR_BLA_Agonist_ratio	NCATS/NCGC	RA	<i>Homo sapiens</i>	Reporter genético
Tox21_AR_LUC_MDAKB2_Agonist	NCATS/NCGC	RA	<i>Homo sapiens</i>	Reporter genético
Tox21_AR_BLA_Antagonist_ratio	NCATS/NCGC	RA	<i>Homo sapiens</i>	Reporter genético
Tox21_AR_LUC_MDAKB2_Antagonist	NCATS/NCGC	RA	<i>Homo sapiens</i>	Reporter genético
ACEA_AR_agonist_80hr	ACEA	RA	<i>Homo sapiens</i>	Proliferação celular
ACEA_AR_antagonist_80hr	ACEA	RA	<i>Homo sapiens</i>	Proliferação celular

Para que uma substância seja classificada na categoria 1, os dados devem ser baseados em evidências provenientes de estudos epidemiológicos em humanos, animais ou métodos não-animais que ofereçam uma capacidade preditiva suficientemente comparável à de humanos ou animais. No entanto, quando houver dúvidas sobre a relevância dos efeitos adversos para a saúde humana, a classificação na categoria 2 pode ser mais apropriada (FOUYET et al., 2024). Diversos testes podem ser utilizados para avaliação de DEs, sejam *in vivo*, *in vitro* e até estudos epidemiológicos. Devido à natureza complexa do sistema endócrino, diversos mecanismos podem causar efeitos adversos e talvez que o uso de testes específicos pode variar a depender da agência reguladora.

Existem algumas dificuldades na detecção e no desenvolvimento de ensaios *in vitro* para identificar os *endpoints* relevantes relacionados à desregulação endócrina. Uma vez que exista uma vasta abrangência de processos fisiológicos, hormônios e receptores que podem ser alvos de substâncias DEs (HILLER-STURMHÖFEL; BARTKE, 1998; NEEDHAM et al., 1999; TAN et al., 2021). Nessa perspectiva, a OECD publicou em 2018 o Documento de Orientação Revisado 150 que fornece as orientações em detalhes sobre os métodos de teste e avaliação para identificar substâncias que possam interferir com o sistema endócrino de organismos vivos (OECD, 2018, p. 20). A Tabela 4 extraída do documento mostra uma estrutura conceitual da OECD para o teste e avaliação de substâncias DEs.

Embora presente em níveis, a estratégia da estrutura conceitual da OECD não possui necessidade de ser seguida linearmente do nível 1 ao 5. Na prática, a utilização dessa abordagem é flexível e depende diretamente da natureza da substância em estudo, do contexto regulatório e da disponibilidade de informações já existentes. Dessa forma, pode-se iniciar a avaliação em qualquer nível, aproveitando dados prévios ou utilizando ensaios mais avançados quando a questão científica exigir. Esse caráter não linear evita a duplicação desnecessária de experimentos, otimiza recursos e permite integrar diferentes tipos de evidências, desde dados físico-químicos e predições *in silico* até estudos *in vivo* de longo prazo. Assim, a OECD estimula uma visão integrada, em que a informação obtida em um nível pode ser suficiente para apoiar decisões regulatórias ou, alternativamente, indicar a necessidade de avançar para níveis mais complexos.

Tabela 4: Estrutura conceitual da OECD para testes e avaliação de desreguladores endócrinos, revisado em 2017.

Toxicidade em mamíferos e não-mamíferos		
<p>Nível 1</p> <p>Dados existentes e informações existentes ou novas que não sejam de testes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Propriedades físicas e químicas, por ex. reatividade de peso molecular, volatilidade, biodegradabilidade • Todos os dados (eco)toxicológicos disponíveis de testes padronizados ou não padronizados • Comparação por leitura, categorias químicas, relações quantitativas de estrutura, atividade e outras previsões <i>in silico</i>, e previsões de modelos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção 	
<p>Nível 2</p> <p>Ensaio <i>in vitro</i> que fornecem dados sobre mecanismo(s) e/ou via(s)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Estrogênio (OECD TG 493) ou afinidade de ligação ao receptor de andrógeno (US EPA TG OPPTS 890.1150) • Transativação do receptor de estrogênio (OECD TG 455, ISO 19040-3), triagem de estrogênio em leveduras (ISO 19040-1 e 2) • Transativação do receptor de andrógeno (OCDE TG 458) • Esteroidogênese <i>in vitro</i> (OECD TG 456) • Ensaio de aromatase (US EPA TG OPPTS 890.1200) • Ensaio de interrupção da tireoide (por exemplo, inibição da tireoperoxidase, ligação da transtirretina) • Ensaio de transativação de receptores retinóides • Ensaio de outros receptores hormonais, conforme apropriado • Triagem de Alto Rendimento 	
Toxicidade em mamíferos		Toxicidade em não mamíferos
<p>Nível 3</p> <p>Ensaio <i>in vivo</i> que fornecem dados sobre mecanismo(s) e/ou via(s) endócrinas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio uterotrófico (OECD TG 440) • Ensaio de <i>Hershberger</i> (OECD TG 441) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio de metamorfose de anfíbios (AMA) (OCDE TG 231) • Ensaio de reprodução de peixes a curto prazo (FSTRA) (OCDE TG 229)2 • Ensaio de peixes de 21 dias (OCDE TG 230) • Tela de esgana-gata feminina androgenizada (AFSS) (OCDE GD 148) • Ensaio FÁCIL. Detecção de substâncias que atuam através de receptores de estrogênio

Nível 4

Ensaaios *in vivo* que fornecem dados sobre efeitos adversos em parâmetros endócrinos relevantes

- Estudo de dose repetida de 28 dias (OCDE TG 407)
- Estudo de dose repetida de 90 dias (OCDE TG 408)
- Ensaio de desenvolvimento puberal e função tireoidiana em ratos machos peripúberes (ensaio PP masculino) (US EPA TG OPPTS 890.1500)
- Ensaio de desenvolvimento puberal e função tireoidiana em ratas peripúberes (ensaio feminino PP) (US EPA TG OPPTS 890.1450)
- Estudo de toxicidade no desenvolvimento pré-natal (OCDE TG 414)
- Estudos combinados de toxicidade crônica e carcinogenicidade (OCDE TG 451-453)
- Teste de triagem de toxicidade para a reprodução/desenvolvimento (OCDE TG 421)
- Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com teste de triagem de toxicidade reprodutiva/desenvolvimento (OCDE TG 422)
- Estudo de neurotoxicidade do desenvolvimento (OCDE TG 426)
- usando embriões de peixe-zebra transgênicos cyp19a1b GFP (*draft* do TG da OCDE)
- Ensaio de sinalização da tiróide embrionária de Xenopus (XETA) (projeto OCDE TG)
- Ensaio de triagem antiandrogênio juvenil medaka (JMASA) (projeto de GD da OCDE)
- Ensaio de rastreio da atividade hormonal juvenil a curto prazo utilizando Daphnia magna (projeto OCDE TG)
- Ensaio rápido de relato de resultados adversos de interrupção androgênica (RADAR) (*draft* do TG da OCDE)
- Teste de desenvolvimento sexual de peixes (FSDT) (OCDE TG 234)
- Ensaio de crescimento e desenvolvimento de larvas de anfíbios (LAGDA) (OCDE TG 241)
- Ensaio de reprodução aviária (OCDE TG 206)
- Teste de toxicidade em fase inicial de vida dos peixes (FELS) (OCDE TG 210)
- Novo documento de orientação sobre o desenvolvimento de copépodes harpacticóides e teste de reprodução com Amphiascus (OECD GD 201)
- Teste de reprodução de Potamopyrgus antipodarum (OCDE TG 242)
- Teste de reprodução de Lymnaea stagnalis (OCDE TG 243)
- Teste de toxicidade de quironomidas (OCDE TG 218-219)
- Teste de reprodução de Daphnia magna (com indução masculina) (OECD TG 211)

- Toxicidade dérmica de dose repetida: estudo de 21/28 dias (OCDE TG 410)
- Toxicidade dérmica subcrônica: estudo de 90 dias (OCDE TG 411)
- Estudo de toxicidade por inalação (subaguda) de 28 dias (OECD TG 412)
- Toxicidade inalatória subcrônica: estudo de 90 dias (OCDE TG 413)
- Estudo de toxicidade oral de dose repetida de 90 dias em não roedores (OCDE TG 409)

Nível 5

Ensaio *in vivo* que fornece dados mais abrangentes sobre os efeitos adversos em parâmetros endócrinos relevantes em partes mais extensas do ciclo de vida do organismo

- Estudo alargado de toxicidade reprodutiva de uma geração (EOGRTS) (OCDE TG 443)
- Estudo de toxicidade reprodutiva em duas gerações (OCDE TG 416, atualização mais recente)
- Teste de reprodução de minhocas (OCDE TG 222)
- Teste de reprodução de enquitreídeos (OCDE TG 220)
- Teste de toxicidade de *Lumbriculus* em águas sedimentares usando sedimentos enriquecidos (OECD TG 225)
- Teste de reprodução de ácaros predadores no solo (OCDE TG 226)
- Teste de reprodução de colêmbolos no solo (TG OECD 232)
- Teste de toxicidade do ciclo de vida dos peixes (FLCTT) (US EPA TG OPPTS 850.1500)
- Teste estendido de reprodução de uma geração Medaka (MEOGRT) (OCDE TG 240)
- Teste de toxicidade aviária de duas gerações em codornas japonesas (ATGT) (US EPA TG OCSPP 890.2100/740-C-15-003)
- Teste de toxicidade do ciclo de vida do quironomídeo em água sedimentar (OCDE TG 233)
- Teste multigeração *Daphnia* para avaliação de DEs (projeto de TG da OCDE)
- Teste estendido de reprodução de uma geração do peixe-zebra (ZEOGRT) (projeto de TG da OCDE)

2.6.1 Métodos *in vitro*

Uma variedade de testes *in vitro* e *in vivo* foi projetada para avaliação de compostos químicos que possam causar interferência nos hormônios sexuais capazes de afetar o processo reprodutivo (OECD, 2018). A OECD disponibiliza diretrizes para avaliação da performance de triagens *in vitro*. Baseado nas informações e tabela de Baker (2001), a Tabela 5 apresenta uma breve atualização de alguns ensaios e *endpoints* estabelecidos pela OECD para os métodos *in vitro* (BAKER, 2001).

Tabela 5: Parte dos principais ensaios aprovados pelas agências reguladoras para avaliação de desreguladores endócrinos.

Ensaio	Descrição	Guideline	Data de Atualização
Afinidade ao Receptor de RE	Ensaio <i>in vitro</i> para detectar a afinidade da substância em ligar-se a um receptor específico	OECD TG No. 493	Junho, 2024
Deteção de Agonistas e Antagonistas RE	Ativação ou inibição de gene repórter ligado ao RE	OECD TG No. 455	Junho, 2021
Deteção de Agonistas e Antagonistas RA	Ativação ou inibição de gene repórter ligado ao RA	OECD TG No. 458	Julho, 2023
Esteroidogênese H295R	Analisa efeitos químicos na esteroidogênese, especificamente na produção de 17 β -estradiol (E2) e testosterona (T)	OECD TG No. 456	Julho, 2023
Aromatase	Deteção de substâncias que inibem a aromatase – complexo enzimático citocromo P450 (CYP 19)	US EPA OOPTS 890.1200	Outubro, 2009
Ensaio de Ligação ao RA	Deslocamento do ligante do receptor. A ligação não pode distinguir entre agonismo ou antagonismo	US EPA OPPTS 890.1150	Outubro, 2009

De acordo com o nível 1 apresentado na tabela 2 da OECD, informações cientificamente relevantes devem ser recolhidas e deverão incluir propriedades físico-químicas, destino e comportamento, bem como quaisquer informações toxicológicas e ecotoxicológicas. Dados de análogos estruturais e de Relações Quantitativas Entre Estrutura e Atividade (QSAR, *quantitative structure-activity relationship*) devem ser

considerados, testes *in vivo* e *in vitro*, ensaios computacionais, informações farmacocinéticas e toxicodinâmicas devem ser considerados (OECD, 2018).

Conforme o Documento de Orientação Atualizado 150, abordagens e modelos integrados se tornaram comumente utilizados. Os métodos que selecionam ensaios de HTS podem ser utilizados para substituir os testes ou recolhimento de dados. O Centro Interagências do Programa Nacional de Toxicologia para Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos desenvolveu a plataforma Ambiente Químico Integrado (ICE), ao qual inclui dados *in vitro*, *in vivo* e previsões de modelos *in silico* apresenta abordagens e modelos validados para o uso (OECD, 2018).

A ação dos hormônios esteroides, como estradiol, se baseia na sua ligação a receptores específicos de alta afinidade em células específicas. Esse ensaio foi utilizado por anos e existem diferentes variações do protocolo, por exemplo, protocolos antigos utilizam citosol uterino de rato como fonte de RE sem realizar purificação das isoformas do receptor. Protocolos mais recentes utilizam proteína recombinante de ER α humana (hrER α) como fonte de RE. Os ensaios de ligação sem células similares envolvendo receptores de andrógeno e progesterona também foram desenvolvidos (GRAY et al., 1997).

Esse ensaio comum para a detecção de compostos estrogênicos é o ensaio de proliferação celular. As linhagens celulares de câncer de mama humano dependentes de estrogênio, como a MCF-7 ou T47D, são comumente utilizadas nesses ensaios. A vantagem desse ensaio se dá por ser uma resposta biológica, que infere uma medida de interação direta de agonistas com o RE e equiparada ao potencial estrogênico (BAKER, 2001; SOTO et al., 1995).

Esses ensaios são úteis para analisar a capacidade de uma substância em ativar a transcrição de um promotor sensível a hormônio. Esse gene geralmente é responsável por codificar uma proteína que pode ser detectada e quantificada em um substrato adequado. A ligação da molécula ao receptor por uma substância de teste tem como consequência a estimulação da expressão do gene repórter (BAKER, 2001).

Compostos químicos podem induzir ou inibir a síntese de esteroides, isso pode ser determinado pelo aumento ou diminuição da produção de estradiol e testosterona,

respectivamente. Esse ensaio utiliza uma linhagem celular de adenocarcinoma humano (células NCI-H295R) que expressa as enzimas envolvidas na esteroidogênese, do colesterol ao estradiol e testosterona (OECD, 2018). Uma das vantagens do uso dessas células está no fato de que representam um sistema *in vitro* único, uma vez que *in vivo* não há nenhum tecido que expresse todas as enzimas de uma só vez.

2.6.2 Métodos *in vivo*

Os ensaios *in vivo* são ensaios de triagem a curto prazo que podem fornecer informações relevantes de atividade estrogênica. Nesse campo, se enquadram dois ensaios clássicos para identificação de substâncias estrogênicas: uterotróficos e de cornificação vaginal para avaliar atividade em sistemas reprodutivos femininos. Já o teste de curto prazo com a finalidade de avaliar efeitos reprodutivos em machos é o ensaio de *Hershberger* (BAKER, 2001; OECD, 2018).

O ensaio uterotrófico foi desenvolvido para identificar substâncias estrogênicas através da alteração do peso uterino em roedores imaturos ou ovariectomizados após a administração da substância em análise por um período entre 3 a 4 dias (DORFMAN; DORFMAN, 1954). Já o de cornificação vaginal é uma avaliação qualitativa utiliza como objeto de estudo as alterações histológicas no epitélio vaginal (MARTIN; CLARINGBOLD, 1960).

O ensaio de *Hershberger* é um teste *in vivo* de curto prazo em ratos pré-púberes castrados cirurgicamente para avaliar a interação de compostos com o RA e se inibem a enzima 5- α -redutase (HERSHBERGER; SHIPLEY; MEYER, 1953). Os compostos são administrados por gavagem oral ou injeção subcutânea ao passo que os resultados são analisados através da mudança de peso em tecidos do trato reprodutivo masculino tanto para efeitos agonistas quanto antagonistas. Há também o modelo alternativo que utiliza o rato desmamado intacto, ao qual não é castrado (OECD, 2018).

2.7 RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE (QSAR)

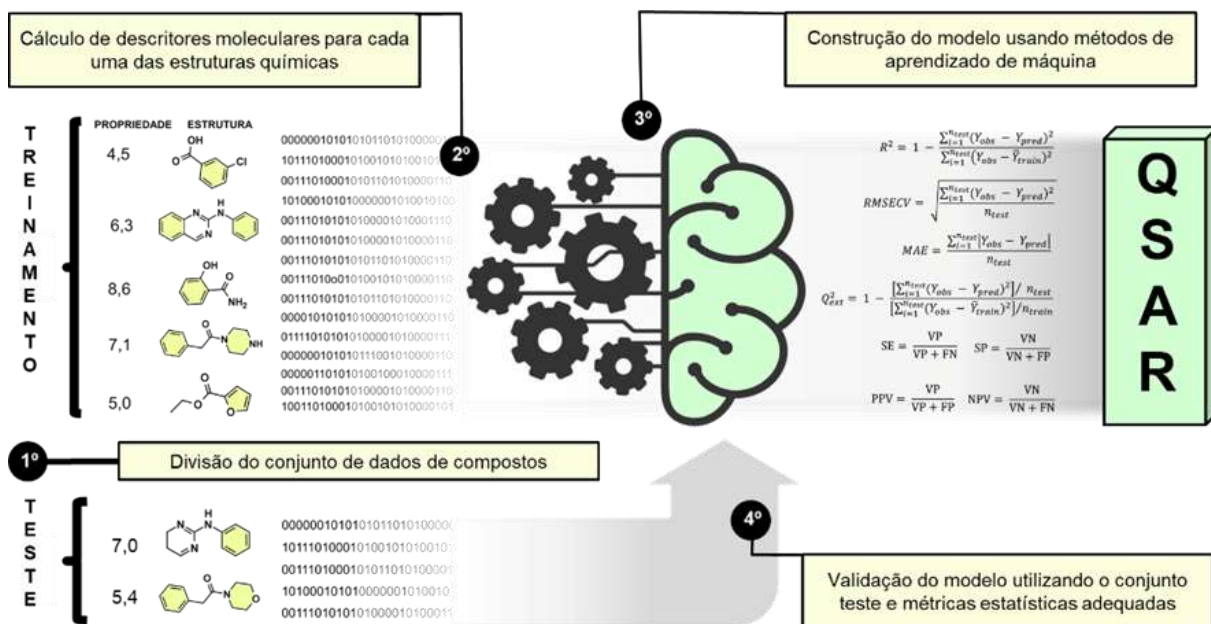
O QSAR consiste em um campo no qual é possível prever propriedades biológicas ou toxicológicas a partir da informação estrutural de um composto (SAHU;

OJHA, 2023). Nesta abordagem, modelos matemáticos são desenvolvidos para estabelecer relações quantitativas, lineares ou não-lineares entre os valores de descritores químicos calculados a partir da estrutura molecular e propriedades biológicas medidas experimentalmente (MURATOV et al., 2020). Historicamente, a modelagem QSAR tem sido aplicada à descoberta de fármacos auxiliada por computador considerando que os métodos apareceram na literatura científica desde a publicação de Hansch *et al.* em 1962, considerado o pioneiro do campo (HANSCH et al., 1962).

O QSAR baseia-se em duas variáveis, a dependente (Y) representada pelos valores de atividade biológica e a independente (X) ao qual refere-se aos valores dos descritores moleculares provenientes das estruturas químicas dos compostos. A Equação 1 explicita a relação entre as estruturas químicas e sua atividade biológica, onde $f(x)$ representa a atividade biológica, k' representa os pesos atribuídos pelo algoritmo e D_n são os descritores moleculares utilizados para calcular os valores das atividades moleculares (TROPSHA, 2010).

$$f(x) = k'(D_1, D_2, \dots, D_n) \text{ (Equação 1)}$$

Figura 5: Esquema de etapas para construção de um modelo computacional baseado em QSAR.



Adaptado de Ferreira et al., 2022.

Como ilustrado na Figura 5, a construção dos modelos de QSAR abrange quatro etapas essenciais que finaliza com a validação (FERREIRA et al., 2022). Em primeiro lugar, os conjuntos de dados são divididos em treinamento e teste. A robustez e validação interna de um modelo serão medidas através do conjunto de treinamento, composto por cerca de 70-80% do conjunto total. Todavia, os dados presentes no conjunto teste serão utilizados para realizar a validação interna do modelo (GRAMATICA, 2007). Após a divisão dos conjuntos, é realizado o cálculo dos descritores moleculares para cada estrutura química e utilizados para construção do modelo e após isso serão validados procedimentos específicos das práticas de QSAR (TROPISHA, 2010).

Mediante ao avanço da capacidade de coletar, processar e armazenar informações as bases de dados de domínios públicos cresceram nos últimos anos. Análogo a esses esforços, por exemplo a consolidação de bibliotecas do TOX21, como a “TOX21 10K library”, inclui aproximadamente 10.000 amostras químicas para cobrir um espaço químico estruturalmente diversificado e servir como um conjunto de dados de bioatividade *in vitro* potencialmente informativas sobre toxicidade e resultados adversos em humanos (RICHARD et al., 2021). Além disso, versões recentes do ECOTOX (*ECOTOXicology Knowledgebase*) fornece dados de ecotoxicidade para mais de 12 mil compostos químicos e espécies ecológicas e a base de dados da ChEMBL cresceu drasticamente nos últimos anos (OLKER et al., 2022; ZDRAZIL et al., 2023). Nessa perspectiva, o QSAR pode ser empregado para o desenvolvimento de modelos robustos para predição de propriedades toxicológicas (BASTIKAR; BASTIKAR; GUPTA, 2022).

2.7.1 Descritores Moleculares

A representação molecular configura-se como um dos alicerces para a construção de modelos de QSAR. Diante da complexidade de substâncias químicas, ao qual envolve a organização molecular e suas propriedades físico-químicas, como os tipos de átomos, número de elétrons, volume molecular e tipos de ligação. Nesse cenário, os descritores moleculares surgiram para contribuir nos avanços das pesquisas de QSAR (LI et al., 2025).

Um descritor molecular pode ser definido, conforme Todeschini e Consonni (2008) como o resultado final de um procedimento lógico e matemático que transforma informações químicas codificadas em um número útil que possa ser compreendido pelo computador para geração dos modelos (TODESCHINI; CONSONNI, 2008). Os descritores moleculares se tratam de uma série de bits, geralmente em formato binário, com a capacidade de codificar tanto a presença quanto a ausência de subestruturas químicas específicas ou propriedades moleculares de uma molécula (MAHMOUD; YOUSEF, 2019).

Eles podem ser divididos em três categorias principais, conforme sua dimensionalidade: unidimensionais, que se baseiam em características físico-químicas e na fórmula molecular, como cLogP e massa molecular; bidimensionais, que envolvem propriedades relacionadas a átomos e ligações, como a quantidade de átomos de nitrogênio; e tridimensionais, que consideram a conformação molecular, como área de superfície acessível ao solvente (XUE; BAJORATH, 2000). Além disso, esses descritores podem ser classificados de acordo com sua natureza, abrangendo aspectos como mecânicos, topológicos, eletrostáticos, geométricos, constitucionais e impressões digitais moleculares (*fingerprints*) (CARRACEDO-REBOREDO et al., 2021).

2.7.2 Aprendizado de Máquina

Aprendizado de Máquina (ML, *Machine Learning*) é uma área interdisciplinar que tem avançado bastante na área de química computacional devido suas diversas aplicações. É definido como uma técnica para os computadores aprenderem de dados sem serem explicitamente programados, utilizando algoritmos que aprendem regras dos dados e produzem resultados (SINHA; GHOSH; SIL, 2023). Os algoritmos de ML podem construir um modelo matemático baseado em dados de treinamento para previsões ou decisões sem serem explicitamente programados para fazerem isso. A primeira vez que utilizaram o termo "*machine learning*" foi por Arthur Samuel em 1959, desde então seus algoritmos desenvolveram-se rapidamente e têm sido aplicados em vários aspectos da pesquisa científica, como, por exemplo, desenvolvimento de fármacos, quimioinformática e toxicidade preditiva (JIAO et al., 2020; SAMUEL, 1959).

O aprendizado de máquina é caracterizado pelo uso de ferramentas estatísticas para generalizar os dados e obter previsões com base no modelo. Nesse sentido, as relações entre estrutura-atividade do QSAR podem ser utilizadas para gerar os modelos a partir dos dados, como a estrutura química e atividade. Pode-se utilizar informações como a atividade do composto e *endpoints* de toxicidade para predição de novos compostos (WANG; GOODMAN; ALLEN, 2021).

No campo da toxicologia esses modelos podem ser utilizados para predição de atividade dos compostos, que envolve predições *in silico* de efeitos toxicológicos *in vivo* e *in vitro* (VO et al., 2020). A abordagem é vantajosa uma vez que determinar a toxicidade de novos compostos seja um desafio devido a variedade de produtos com potencial metabólico, efeitos idiossincráticos que ocorrem em pequenas partes da população e também há complexidade de sistemas *in vivo*.

A aprendizagem supervisionada aprende uma função conforme a um determinado conjunto de dados de treinamento rotulados. Quando novos dados (teste e validação) chegam, ele pode prever os resultados com base na função, uma vez que os alvos do conjunto de treinamentos já estejam rotulados (com valores de atividade biológica, por exemplo). Seus algoritmos incluem predições de regressão e de classificação. Já os não-supervisionados referem-se aos modelos que são treinados possuindo características conhecidas, contudo possui dados não rotulados, comumente utilizados para reconhecimento de padrões ou técnicas de agrupamento. Por fim, o semissupervisionado tem o objetivo de melhorar a performance do modelo comparado às outras duas categorias ao utilizar tanto dados rotulados quanto não rotulados (VO et al., 2020; WANG; GOODMAN; ALLEN, 2021).

2.7.3 Aprendizado Profundo

O aprendizado profundo (DL, *Deep Learning*) é um tipo de aprendizado de máquina que é melhor em alguns casos. Essa ferramenta modela através de conceitos aninhados e uso de múltiplas camadas que mimetizam uma arquitetura inspirada no cérebro humano para extrair características automaticamente. Suas vantagens abrangem o processamento de dados não tratados, definição de características e aprendizado de relações complexas. As redes neurais artificiais

(ANNs, *artificial neural networks*) usam unidades lineares, recebendo entradas com pesos e viés para fornecer os resultados. As camadas densas, empilhando em unidades lineares, formam uma rede neural profunda (DNN, *deep neural network*). A arquitetura do DNN se caracteriza por camadas de entrada e saída e entre elas múltiplas camadas ocultas como ilustrado na Figura 6. Além disso, há funções de ativação que adicionam não linearidade entre as camadas densas e contribuindo para o processamento de associações complexas (SINHA; GHOSH; SIL, 2023).

Os algoritmos de DNN devem conter no mínimo três camadas: camada de entrada, a oculta e de saída. Os descritores moleculares são os dados de entrada com o propósito de prever a atividade biológica ou moléculas de classificação. Para realizar o cálculo das variáveis ocultas ou valores de saída, os neurônios da camada de entrada são calculados pelos pesos, logo somado pelo termo de viés e aplicados à função de ativação conforme a Equação 2 (GHASEMI et al., 2018):

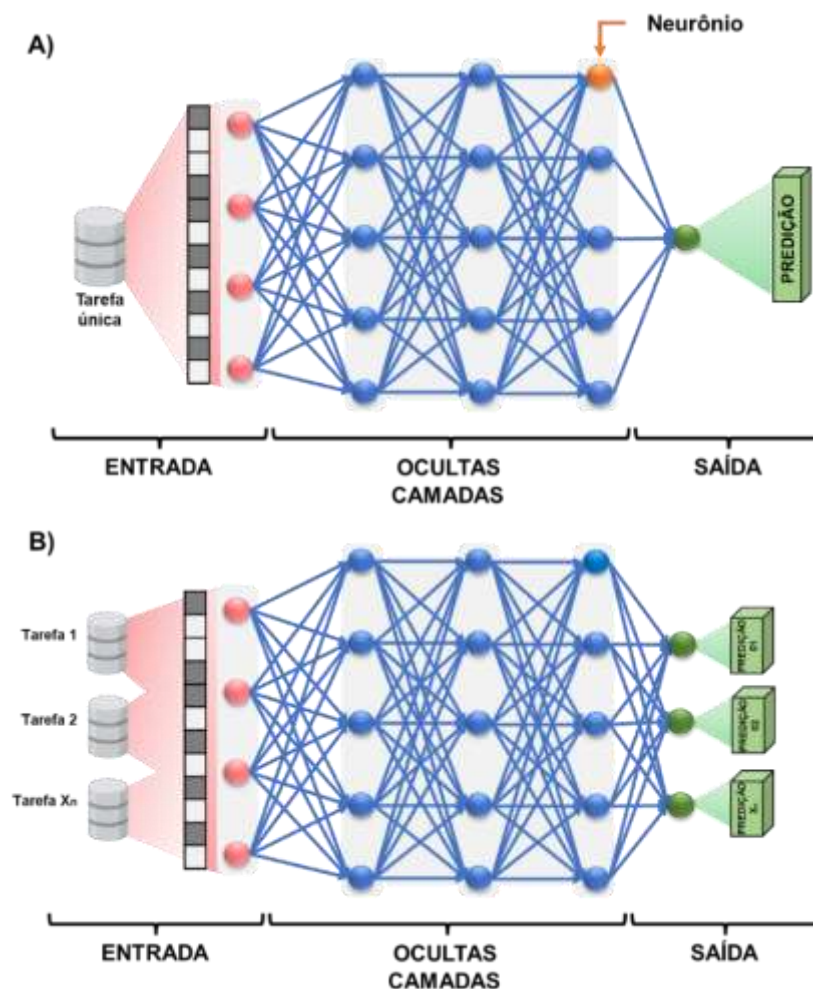
$$u = f\left(\sum_{i=1}^N X_i \times W_i + b\right) \text{ (Equação 2)}$$

Onde u é a saída do modelo, X_i representa os dados de entrada (descritores), W_i os pesos atribuídos a cada entrada para determinar a importância na tomada de decisão, b refere-se aos termos de viés e $f()$ representa a função de ativação.

Um perceptron ou um único neurônio artificial é a unidade fundamental das DNNs e realiza a propagação direta de informações, ou seja, em um fluxo contínuo. Dado um conjunto de entradas (x_1, x_2, \dots, x_m) para o perceptron, atribui-se pesos flutuantes e suas tendências para mudar o peso (w_1, w_2, \dots, w_m) e então se multiplica correspondentemente para obter uma soma ponderada de todos os dados. Os descritores moleculares definidos como representações matemáticas em números binários de uma molécula são utilizados como dados de entrada. Eles podem ser divididos em medidas experimentais (LogP, refratividade molecular, momento dipolar e outras) e descritores moleculares teóricos (MAURI; CONSONNI; TODESCHINI, 2017; OROSZ; HÉBERGER; RÁCZ, 2022). Alguns dos pacotes que permitem o treinamento das redes neurais são: PyTorch, Tensorflow e o MXNet (CHOUDHARY et al., 2022).

Os algoritmos de DL apresentam diferentes arquiteturas e tipos de redes neurais, aos quais cada uma delas apresentam suas peculiaridades e finalidade diferente. Alguns dos modelos mais comuns incluem as Redes Neurais Convolucionais (CNNs, *convolutional neural network*), redes neurais recorrentes (RNNs, *recurrent neural network*), redes adversárias generativas (GANs, *Generative Adversarial Networks*), recorrentes longas de curto prazo (LSTMs, *Long Short Term Memory*) e unidade recorrente fechada (GRU, *gated recurrent unit*) e entre outras. No campo do DL, as CNNs são as arquiteturas com maior utilização comparada aos demais.

Figura 6: Esquemas evidenciando a arquitetura de modelos de aprendizagem profunda de (a) tarefa única e (b) multitarefa.



Fonte: autoria própria.

Uma vez que elas são úteis para processar dados estruturados em várias matrizes, como, por exemplo, uma imagem colorida formada por três matrizes 2D com intensidade de pixels nos três tipos de cores. Já as redes neurais recorrentes são úteis no processamento de linguagem natural, tradução de imagens e entre outros. São vantajosas no processamento de linguagem uma vez que conseguem lidar com informações sequenciais com um sistema de retropropagação na sua arquitetura, permitindo que informações anteriores influenciem em saídas futuras (JIAO et al., 2020).

2.7.4 Aprendizagem Multitarefa

A aprendizagem multitarefa é uma abordagem de transferência indutiva que melhora a generalização do modelo usando as informações dos conjuntos de dados de tarefas relacionadas como um viés indutivo. A abordagem faz isso aprendendo tarefas em paralelo enquanto usa uma representação compartilhada, ou seja, o que é aprendido por uma tarefa pode influenciar no aprendizado de outras tarefas (ALLENPACH; HISS; SCHNEIDER, 2024; CARUANA, 1998). A Figura 6 apresenta um breve resumo das diferenças entre os modelos de tarefas únicas e os de multitarefas, onde o primeiro aprende um modelo por vez, enquanto o segundo transfere conhecimento para os demais nós contribuindo para geração dos modelos.

Alguns avanços durante os últimos anos permitiram o uso das técnicas de multitarefa no campo de descoberta e desenvolvimento de fármacos e também no campo da toxicologia. Chiu, Tung e Wang (2024) utilizaram metodologias de multitarefa para o desenvolvimento de modelos com poucos dados para aprender simultaneamente três tarefas relevantes para a absorção pulmonar que incluem a constante de taxa de absorção de pulmão perfundido isolado (k_{aIPL}) e coeficientes de permeabilidade aparente (PAPP) dos modelos que utilizam células Caco-2 e Calu-3. Dois estudos de caso de medicamentos inalatórios e sensibilizadores respiratórios revelaram a aplicação potencial deste modelo, que pode servir como uma ferramenta valiosa para prever a absorção pulmonar de produtos químicos (CHIU; TUNG; WANG, 2024).

Pesquisas conduzidas por Halder, Moura e Cordeiro (2023) utilizaram a abordagem de multitarefa *in silico* para predição de ecotoxicidade de DEs. O presente estudo avaliou modelagem quantitativa multitarefa de QSAR desenvolvida para prever ecotoxicidade de DEs contra 170 espécies biológicas pertencentes a seis grupos. Os resultados mostraram que o modelo mais preditivo proporcionou uma precisão geral de 87% e enfatizaram a importância do modelo linear e os modelos consensos gerados para melhorar a precisão preditiva dos modelos de validação aberta (HALDER; MOURA; CORDEIRO, 2023).

Outro estudo que discutiu o uso de modelos multitarefa e de tarefa única para DEs foi elaborado por Zhang et al. (2013). Os autores utilizaram os modelos para prever a afinidade de ligação de compostos aos receptores de estrogênio, envolvidos na DE. Em suas conclusões, os achados demonstraram que a aprendizagem multitarefa apresentaram resultados mais favoráveis a um pequeno conjunto de dados quando comparados ao de aprendizagem única, indicando que pode ser uma abordagem favorável para compreender o mecanismo de ação da desregulação endócrina e prever a atividade ER de desconhecidos (ZHANG et al., 2013).

2.8 BOAS PRÁTICAS DE CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS QSAR

Em virtude do aumento do número de dados e, conseqüentemente, dos métodos de QSAR, foram estabelecidos diretrizes e recomendações de boas práticas de desenvolvimento e validação dos modelos de QSAR. A Organização Para a Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD) publicou em 2004 um conjunto de princípios para validar os modelos de QSAR para o uso na regulamentação de compostos (OECD, 2023).

Os princípios envolvidos nas boas práticas são: a) atividade biológica ou propriedade bem definido; b) algoritmo claro; c) realizar o domínio de aplicabilidade (DA) definido; d) avaliação apropriada da robustez e preditividade; e) interpretação mecanística para aprofundar o conhecimento sobre a relação estrutura-atividade em estudo (OECD, 2023).

O objetivo do trabalho é desenvolver uma ferramenta baseada em inteligência artificial para predição do potencial de desregulação endócrina relacionado aos receptores de estrógeno e andrógeno de compostos químicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compilar e padronizar conjuntos de compostos com dados relacionados aos ensaios quanto desregulação de RA e RE disponibilizados pelas bases de dados ToxCast e Tox21. Construir e validar modelos de aprendizagem multitarefa utilizando algoritmos de redes neurais profundas através desses conjuntos;
- Comparar o desempenho estatístico dos modelos de aprendizagem multitarefa com modelos de ML para tarefas únicas;
- Utilizar as predições do modelo de aprendizagem multitarefa como descritores toxicológicos para predição de desregulação endócrina *in vivo*;
- Disponibilizar os modelos com melhor performance estatística em repositórios do GitHub.

4.1 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

4.1.1 Coleta e preparo de dados

Coletou-se os dados da base Tox21 e ToxCast de ensaios com compostos e suas respectivas atividades (ativo ou inativo) reportadas referentes às AOPs do RA e RE (HUANG, 2022; TAN et al., 2022). Em seguida, realizou-se as seguintes etapas:

- Atividade em Receptores de Androgênio. Coletou-se dados de 23 ensaios referentes à atividade relacionadas à Via de Efeito Adverso mediada pela ação sobre RA. Essa AOP possui sete etapas das quais incluem o evento de inicialização referente aos ensaios de ligação ao receptor, os eventos chaves que incluem o recrutamento de correguladores, ligação à cromatina, atividade sobre o fator de transcrição, expressão gênica e proliferação molecular. Por fim, o desfecho adverso relacionado à AOP da qual avalia *in vivo* as mudanças no tamanho e peso de 5 tecidos de órgãos masculinos cuja dependência se correlaciona com a ação sobre os RAs. Selecionou-se como desfecho adverso os ensaios de *Hershberger* cuja propriedade de atividade Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAEL, *No Observed Adverse Effect Level*) e Menor Nível com Efeito Adverso Observado (LOAEL, *Lowest Observed Adverse Effect Level*) sobre os roedores estavam em mg/kg/dia (KLEINSTREUER et al., 2017).
- Atividade em Receptores de Estrogênio. Coletou-se dados referentes aos 28 ensaios relacionada à Via de Efeito Adverso mediada pela ação sobre RE. Essa AOP possui sete etapas que incluem MIE referente à ligação nos RE, os eventos chaves que envolvem, em ordem, a dimerização do receptor, ligação à cromatina, atividade no fator de transcrição, expressão gênica e pôr fim a proliferação celular. O desfecho final foi o ensaio uterotrófico ao qual descreve o aumento do peso uterino nas escalas de NOAEL e LOAEL (BROWNE et al., 2015; JUDSON et al., 2015).

Em seguida, deu-se início ao processo de preparo e padronização química dos conjuntos de dados. Essa etapa incluiu tanto a identificação quanto a correção de

erros nos conjuntos de compostos de acordo com protocolos estabelecidos por Fourches et al. (2016). As etapas do preparo químico incluem a remoção de dados incompletos e também compostos químicos inorgânicos, organometálicos, contra-íons e misturas. A partir da estrutura dos SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) dos compostos do conjunto de dados, que representa uma notação química que permite ao usuário representar a estrutura química de uma forma que o computador seja capaz de aprender, realizou-se a normalização de quimiótipos específicos e padronização das formas tautoméricas. Além disso, detectou-se e excluíram fontes de dados inconsistentes, dados duplicados ou erros sistemáticos (WEININGER, 1988; FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2016).

Quanto ao conjunto de dados *in vivo* para a via androgênica, utilizou-se os ensaios de *Hershberger* para geração das predições de modelo da camada 2. A classificação dos compostos como ativos ou inativos, em relação às atividades agonistas ou antagonistas sobre as vias androgênicas, seguiu os critérios estabelecidos por Browne et al. (2018):

1. Compostos classificados como ativos:

- Considerou-se ≥ 2 ensaios de *Hershberger* com resultados ativos para o mesmo composto; ou
- Considerou-se um ensaio *Hershberger* ativo e outro ensaio *in vivo* ativo; ou
- Compostos com maior número de ensaios ativos do que inativos.

2. Compostos classificados como inativos:

- Considerou-se ≥ 2 ensaios de *Hershberger* com resultados inativos, sem nenhum resultado ativo; ou
- Considerou-se mais de um resultado inativo para o ensaio de *Hershberger*, sem nenhum resultado ativo.

Os ensaios uterotróficos em roedores são ditos como “padrão-ouro” para identificar compostos ativos para os receptores de estrógeno e foram selecionados para descrever o estudo do desfecho final, alteração no peso do útero dos roedores.

Os dados duplicados foram tratados de forma semelhante aos de *Hershberger* e os que foram coletados por Kleinstreuer *et al.* (2016) que desenvolveu uma base de dados que fornecia os valores de atividade (1) e inatividade (0) para cada composto (KLEINSTREUER *et al.*, 2016; US EPA, 2015a, 2015b).

4.1.2 Análise de espaço químico

A análise do espaço químico foi executada através do algoritmo *t*-SNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) que consiste em reduzir e visualizar a dimensionalidade não linear de conjuntos de dados complexos. O *t*-SNE gera um baixo número de características que preserva a relação entre as amostras do conjunto o melhor possível através das bibliotecas pandas v.2.1.2 (<https://pandas.pydata.org/>), SciKit-Learn v.1.3.2 (<https://scikit-learn.org/stable/>) incorporada em Python v.3.8 (<https://www.pythong.org>).

A redução da dimensionalidade realizou-se através dos *scaffolds* calculados do programa de código aberto RDKit v.2023.09.1 (<https://www.rdkit.org>), executado em Python v.3.8 e incorporados na ferramenta de *t*-SNE. Os *scaffolds* são utilizados principalmente para representar as estruturas centrais de compostos bioativos e podem ser representados pela estrutura *Murcko* proposta por Bemis e Murcko (1996) que disseca as moléculas em partes como sistemas de anéis, ligantes, cadeias laterais e estrutura *Murcko* que representa os anéis aos seus ligantes (BEMIS; MURCKO, 1996; TÜRKOVA; JAIN; ZDRAZIL, 2019; YU *et al.*, 2023).

Após a geração dos *scaffolds*, gerou-se um mapa de duas dimensões (2D) com o *t*-SNE que providenciou associações entre as diferentes categorias. Para a visualização do espaço, foi utilizado o agrupamento do conjunto de dados através do *K-means*. O cálculo do coeficiente de silhueta médio (*s*) determina o número de agrupamentos ideal para o conjunto de dados conforme a Equação 3.

$$s(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max\{a(i), b(i)\}} \text{ (Equação 3)}$$

Na Equação 3, a silhueta média (*s*) calcula por meio da distância média intracluster (*a*) entre as amostras (*i*) e a distância média do cluster mais próximo (*s*)

para cada amostra. Os valores variam entre +1 e -1, onde os valores negativos tendem a apresentar amostras atribuídas ao agrupamento errado.

Realizou-se a análise de similaridade química de agrotóxicos, excipientes de cosméticos e fármacos com os conjuntos de dados de DEs para a distribuição e aplicabilidade do modelo através do DataWarrior v06.01.00 (ALVES et al., 2018; SANDER et al., 2015). Por meio dos fragmentos moleculares do tipo *fingerprint* e do coeficiente de tanimoto estabeleceram-se as similaridades estruturais no conjunto de compostos total com 18.602 moléculas.

Através das bibliotecas pandas v.2.1.2, RDKit v.2023.09.1 e seaborn 0.12.1 implementadas em Python, os cálculos das propriedades físico-químicas de moléculas a partir de suas representações SMILES foram realizados e em seguida uma matriz de gráficos de dispersão das propriedades referentes ao coeficiente de partição octanol/água (LogP), solubilidade estimada (LogS), número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), peso molecular (MW), ligações rotacionáveis e área de superfície de polaridade topológica (tPSA).

4.1.3 Modelos de camada 1

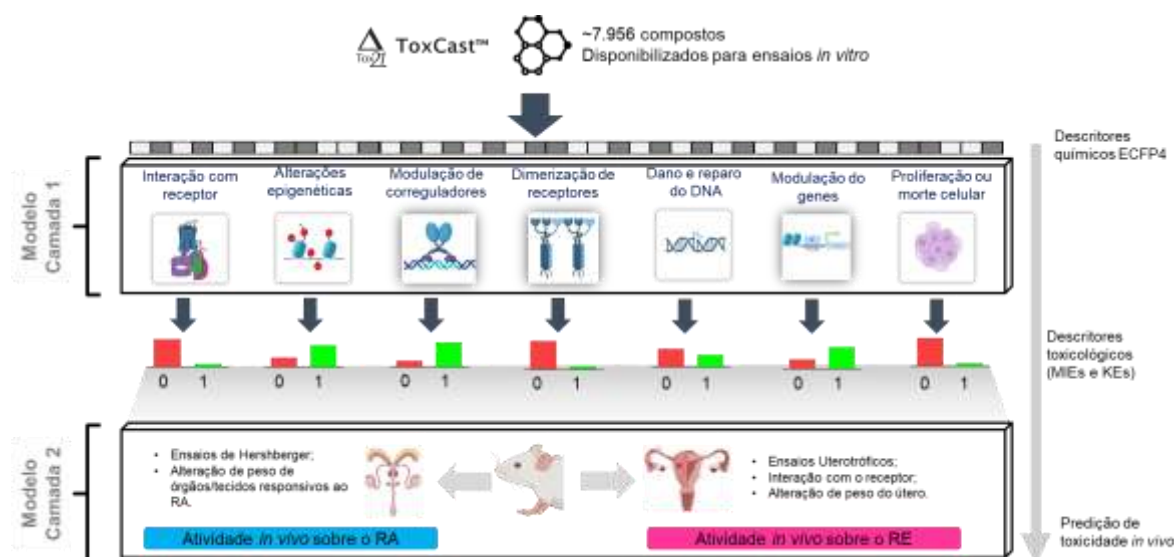
Estruturou-se a metodologia em duas camadas. A primeira envolveu a predição da atividade *in vitro* de compostos com atividade reportada para as AOPs dos REs e RAs. Para essa etapa, foram gerados modelos multitarefa de aprendizado de máquina e aprendizado profundo, correspondentes aos MIEs e KEs das respectivas AOPs. As saídas desses modelos (0 = inatividade; 1 = atividade) foram utilizadas na construção de descritores biológicos, aqui denominados descritores toxicológicos. É importante destacar que todos os compostos foram submetidos à camada 1, independentemente de suas predições de atividade, de modo que a função desta etapa foi a geração de informações adicionais, e não a seleção de moléculas positivas.

Na segunda camada, os descritores toxicológicos foram combinados aos descritores químicos ECFP4 (*Extended-Connectivity fingerprints* de raio 4), formando o espaço de representação molecular utilizado para a predição da atividade *in vivo*. Três conjuntos de dados foram empregados, contendo os SMILES das moléculas e

as respectivas atividades biológicas avaliadas nos seguintes ensaios: (a) atividade agonista do RA pelo teste de Hershberger; (b) atividade antagonista do RA pelo mesmo teste; e (c) atividade sobre o RE pelo ensaio uterotrófico. Cada conjunto foi processado separadamente, e modelos de aprendizado supervisionado foram gerados utilizando os algoritmos *Random Forest* e *k-Nearest Neighbour*, com validação cruzada do tipo *leave-one-out* e otimização de parâmetros.

Assim, todos os compostos foram processados em ambas as camadas: a primeira destinada à predição da atividade *in vitro* e à geração de descritores biológicos, e a segunda responsável pela predição da atividade *in vivo* a partir da combinação de descritores químicos e biológicos.

Figura 7: Esquema elucidando os modelos gerados para camada 1 (predição de atividade *in vitro*) e camada 2 (predição de atividade *in vivo*).



Fonte: autoria própria.

4.1.3.1 Cálculo de descritores moleculares

O cálculo dos descritores do tipo impressões digitais moleculares (*fingerprints*) classificados como Morgan por meio dos pacotes disponíveis no RDKit v.2023.09.1 executados em Python v.3.8. As impressões do tipo ECFPs capturam as características moleculares relevantes para a atividade molecular. Cada átomo da molécula é atribuído a um identificador inicial, em seguida é feita uma série de

iterações onde a informação de cada átomo se atualiza com base nos átomos vizinhos. Através das iterações, o identificador de cada átomo se atualiza até que o identificador resultante capture a conectividade local ao redor do átomo (ROGERS; HAHN, 2010).

Utilizou-se um raio equivalente a 2, diâmetro igual a 4 configurando como ECFP4 e vetores contendo 2048 *bits*. O processo de desenvolvimento desses descritores se dá por 3 etapas:

1. Cada átomo tem um identificador inteiro atribuído. Após isso, a função *hash* é estabelecida para que as propriedades sejam compactadas em um valor inteiro;
2. Estágio de atualização das iterações, onde cada identificador é atualizado conforme os átomos vizinhos até um diâmetro específico seja identificado até que atinja determinado diâmetro. Ao final, os descritores transcrevem as subestruturas em um sistema binário através de uma cadeia de *bits* indicando a ausência ou presença dessas subestruturas, representada pelo número 0 ou 1, respectivamente;
3. Remoção de identificadores duplicados com a finalidade de resultar em um único representante.

4.1.3.2 Divisão do conjunto de dados

Tanto os compostos com atividades biológicas *in vitro* reportados para múltiplos eventos chaves de AOPs relacionada a reprodução feminina quanto masculina foram alocados em uma matriz esparsa. Seguindo as boas práticas de construção e validação de modelos QSAR, a matriz esparsa dividiu-se de forma randômica em conjunto de treinamento, teste e validação na proporção de 8:1:1 através do sistema de código aberto Scikit-Learn v.1.3.2.

Além disso, aplicou-se o método de validação externa *5-fold*. Esse método consiste em dividir o conjunto total de dados em 5 subconjuntos iguais ao qual o processo se repetirá 5 vezes, trocando a parte usada para o teste a cada vez. No final, a média dos resultados dessas 5 rodadas avalia o modelo.

4.1.3.3 Modelos de aprendizado multitarefa

O desenvolvimento dos modelos de aprendizado de máquina multitarefa focou na predição da atividade em receptores de estrógeno e andrógeno, bem como outros *endpoints* de toxicidade relacionados às AOPs. Nessa perspectiva, as Redes Neurais de Propagação Direta (FNN, *Feedforward Neural Networks*) foram implementadas com o pacote TensorFlow v.2.9 em Python v.3.8. Uma vez que a capacidade das FNN de modelar relações complexas e não-lineares entre os descritores moleculares e as atividades biológicas, um aspecto crucial para a predição de desregulação endócrina.

As FNN consistem em uma arquitetura de rede neural onde os dados fluem das camadas de entrada para as camadas de saída de forma unidirecional, sem formação de ciclos. A camada de entrada das FNN recebe os descritores moleculares, como SMILES, que são convertidos em vetores de entrada para os neurônios. Esses vetores passam por uma ou mais camadas ocultas, onde são aplicadas funções de ativação que introduzem não-linearidade, permitindo que a rede capture padrões complexos nos dados. Neste estudo, foram testadas diversas funções de ativação, incluindo ReLU (Rectified Linear Unit), ELU (Exponential Linear Unit) Leaky ReLU, SeLU (Scaled Exponential Linear Unit), tanh (tangente hiperbólica) e softmax. A ELU combina aspectos das funções ReLU e Leaky ReLU, oferecendo rápida taxa de aprendizado e maior exatidão ao deslocar a ativação média para mais perto de zero.

Os modelos foram otimizados através da biblioteca *Optuna*, que realizou a busca dos melhores hiperparâmetros, incluindo o tamanho do *batch size* (32), a taxa de dropout (0,418612), a função de regularização (0,000121), taxa de aprendizagem ($5,46 \times 10^{-5}$), os otimizadores (ADAM), o número de camadas ocultas (1) e o número de neurônios por camada (21). O treinamento dos modelos foi conduzido com o algoritmo de retropropagação (*backpropagation*), utilizando o otimizador Adam (*Adaptive Moment Estimation*), SGD (*Stochastic Gradient Descent*) e RMSProp (*Root Mean Square Propagation*) para ajustar os pesos da rede, minimizando a função de perda categórica durante o treinamento.

Para enfrentar o desafio do desbalanceamento do conjunto de dados, onde há uma predominância de compostos inativos em relação aos ativos (tóxicos), implementou-se abordagens de sobreamostragem (*overfitting*) com ADASYN e

calibração de limiar (*threshold-moving*). O ADASYN (Adaptive Synthetic Sampling Approach for Imbalanced Learning) é uma técnica que gera amostras sintéticas da classe minoritária durante o treinamento do modelo, baseando-se na dificuldade de classificação das amostras, o que é determinado pela proporção de vizinhos de classes diferentes nos *k-nearest neighbours* (kNN) (HE et al., 2008). As amostras sintéticas são geradas de forma proporcional à dificuldade de classificação, conforme descrito na Equação 4, ajustando o balanceamento do conjunto de dados.

$$G_i = \frac{r_i}{\sum_{i=1}^{n_{min}} r_i} \times G \text{ (Equação 4)}$$

Onde G simboliza o número total de exemplos sintéticos a serem gerados, r_i é a dificuldade de classificação de cada amostra (x_i), dado pela razão entre o número de vizinhos mais próximos de x_i que pertencem a classe majoritária, e o número total de vizinhos a ser considerado.

Empregou-se a calibração de limiar (*threshold-moving*) para ajustar os limiares de decisão dos classificadores binários após o treinamento. Em classificações binárias, as instâncias com probabilidade positiva maior ou igual a 0,5 são geralmente classificadas como positivas, enquanto as demais são consideradas negativas. No entanto, em conjuntos de dados desbalanceados, essa abordagem pode favorecer a classe majoritária. Para mitigar esse viés, após o treinamento, foram calculadas as probabilidades de cada amostra pertencer à classe positiva. Com base nessas probabilidades e nos rótulos verdadeiros, foi gerada a Curva Característica de Operação do Receptor (ROC), na qual cada ponto corresponde a um limiar específico. O limiar que maximiza a média geométrica (G-mean), calculada conforme a Equação 5, foi selecionado como ideal para o classificador, equilibrando as taxas de verdadeiros positivos (recall) e de especificidade.

$$G - mean = \sqrt{recall \times especificidade} \text{ (Equação 5)}$$

Essas abordagens permitiram o desenvolvimento de modelos robustos e com maior capacidade preditiva, integrando técnicas de aprendizado profundo e estratégias para lidar com o desbalanceamento dos dados, contribuindo para uma

melhor compreensão dos mecanismos de ação dos DEs e para a predição dos efeitos adversos associados.

4.1.3.4 Modelos de aprendizado de tarefa única

Utilizou-se o conjunto de dados *in vitro* para gerar modelos QSAR de classificação de tarefa única, também chamados de *singletask*, ao qual atribuímos como o baseline desse estudo. Os modelos de tarefa única foram construídos a partir dos algoritmos de Floresta Randômica (*RF, Random Forest*), Máquina de Vetores de Suporte (*SVM, Support Vector Machine*) e também o algoritmo *Gradient Boosting* (*LGBM, Light Gradient Boosting Machine*).

As árvores de decisão (*DT, decision tree*) são assim chamadas por mimetizarem a forma de uma árvore, onde um modelo robusto é treinado para procurar aleatoriamente o melhor recurso para classificação dos dados em subconjunto distintos de uma forma baseada em regras para formar ramificações tais como os galhos em cada etapa (SAFAVIAN; LANDGREBE, 1991). Resultados de modelos a partir de DT tem sido satisfatório para hepatotoxicidade, com precisão superior à 80%. Entretanto, essa metodologia é propensa ao sobreajuste e os resultados podem exigir uma validação adicional. Já o algoritmo de RF é um método de aprendizado em conjunto onde múltiplas árvores de decisão são geradas aleatoriamente e combinadas através de esquema de votação majoritária. Embora sejam mais complexos e menos interpretáveis, os modelos de floresta randômica funcionam bem ao utilizar conjuntos de dados grandes e são mais resistentes ao sobreajuste (WANG; GOODMAN; ALLEN, 2021).

O SVM é uma das ferramentas de ML mais populares da quimioinformática. A técnica realiza a classificação ao aplicar uma função linear ou não linear para mapear as características de compostos em um espaço de alta dimensão, sendo assim cria um limite de hiperplano ideal para separar os compostos com base na toxicidade. No entanto, os SVM's podem exigir longos períodos para treinamento de conjuntos de dados grandes e os modelos resultantes podem ser difíceis de interpretar (DRUCKER et al., 1996; JIAO et al., 2020).

Utilizou-se a otimização bayesiana para ajustar os hiperparâmetros dos modelos de tarefa única a partir dos pacotes presentes no Scikit-Learn v.1.3.2. O teorema bayesiano consiste na estatística de probabilidade utilizada para classificar através de suposições ingênuas de independência entre as características. Sendo assim, essa função encontra os melhores hiperparâmetros para um modelo com base em uma busca em um intervalo definido. Embora não haja uma única fórmula simples que determine a otimização bayesiana, o processo pode ser descrito a partir da Equação 6 (SNOEK; LAROCHELLE; ADAMS, 2012).

$$\emptyset_{t+1} = \arg \max_{\emptyset} \alpha(\emptyset|D_t) \text{ (Equação 6)}$$

A partir dessa equação, o \emptyset representa os hiperparâmetros, o D_t representa os conjuntos de dados observados até a iteração t . E a função de aquisição é representada por $\alpha(\emptyset|D_t)$. Essa equação explora o processo iterativo em sua essência da otimização bayesiana, que é maximizar a função de aquisição com o objetivo de propor novos hiperparâmetros a serem avaliados.

4.1.3.5 Avaliação estatística

A validação interna e externa do desempenho dos modelos de QSAR foram avaliadas utilizando a exatidão (ACC), recall, especificidade (SP), precisão ou valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), coeficiente de correlação de mathews (MCC), Kappa de Cohen (κ), média geométrica (G-Mean) e pela medida F (F1). Essas métricas avaliam conformes as taxas de acertos e erros de previsão de um modelo e podem ser visualizados através de uma matriz de confusão, como indica a Tabela 6.

Tabela 6: Matriz da confusão de modelos de classificação binário.

Valores das Classes		Reais	
		Positivo	Negativo
Preditos	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

Os modelos de classificação binário procuram prever se o seu valor real consegue ser predito de forma eficiente e com uma alta taxa de acerto. No contexto

da desregulação endócrina, o modelo busca maximizar a taxa de verdadeiro-positivo (VP) e verdadeiro negativo (VN), isto é, a taxa de compostos preditos como tóxicos, quando seu valor realmente é tóxico e a taxa de compostos preditos como não-desreguladores quando eles realmente não possuem atividade desregulador endócrino, respectivamente. À medida que maximiza os valores de VP e VN, minimizam as taxas de predição falsas, descritos pelos valores de falso-positivo (FP) e falso-negativo (FN).

Com base nesses parâmetros de taxas de acertos e erros destacados pela matriz da confusão, as métricas estatísticas serão calculadas a partir disso. As métricas se dão pelas equações a seguir:

$$ACC = \frac{VP + VN}{N} \quad (\text{Equação 7})$$

$$Recall = \frac{VP}{VP + FN} \quad (\text{Equação 8})$$

$$SP = \frac{VN}{VN + FP} \quad (\text{Equação 9})$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \quad (\text{Equação 10})$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FP} \quad (\text{Equação 11})$$

$$MCC = \frac{VP \times VN - FP \times FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde N representa o número total de exemplos no conjunto de dados. O G-Mean foi descrito através da equação 5 e quanto aos demais, foram descritos na Equação 13 e 14. O F1-score representa a média harmônica entre a precisão (precision) e a sensibilidade (recall), sendo particularmente útil em contextos com classes desbalanceadas, onde a exatidão pode ser enganosa. Ele penaliza fortemente casos em que uma das duas métricas é muito baixa. Em problemas com múltiplas classes, o F1 pode ser calculado de formas diferentes, sendo o $F1_{\text{weighted}}$ (Equação 14) uma média ponderada pelo número de amostras reais em cada classe. Isso significa que classes majoritárias têm mais peso no resultado final, podendo ocultar

um desempenho ruim em classes minoritárias. Já a fórmula do κ (Equação 15) é utilizada para avaliar a correlação entre a proporção de concordância observada (P_o) e a proporção de concordância esperada ao acaso (P_e) entre dois classificadores para categorizar um conjunto de dados binários.

$$F1 = 2 * \frac{\text{precisão} \times \text{recall}}{\text{precisão} + \text{recall}} \quad (\text{Equação 13})$$

$$F1_{\text{weighted}} = \sum_{i=1}^K \frac{n_i}{N} \times F1_i \quad (\text{Equação 14})$$

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} \quad (\text{Equação 15})$$

Onde o K representa o número total de classes, n_i é o número de amostras da classe i , N é o número total de amostras e $F1_i$ representa o $F1$ da classe i .

4.1.4 Modelo de camada 2

Os modelos DNN multitarefa mais promissores, desenvolvidos a partir dos ensaios *in vitro* na primeira camada, foram empregados na segunda camada para prever a atividade *in vivo* em machos e fêmeas, utilizando os ensaios de *Hershberger* e uterotrófico, respectivamente. O modelo de melhor desempenho da primeira camada foi carregado e utilizado para gerar descritores biológicos, que correspondem às saídas intermediárias do DNN. Esses descritores biológicos foram então combinados aos descritores moleculares ECFP4, formando um único vetor de características para cada composto.

4.1.4.1 Divisão do conjunto de dados

A robustez dos modelos de camada 2 desenvolvidos foi determinada utilizando a técnica de validação cruzada *Leave-One-Out* (LOO-CV) e também validação cruzada externa 5-fold. No procedimento de LOO-CV, os conjuntos de dados *in vivo* de *Hershberger* e uterotróficos são divididos de forma que, em cada iteração, uma única amostra é isolada para ser utilizada como conjunto de teste, enquanto as amostras remanescentes compõem o conjunto de treinamento. Essa metodologia é amplamente empregada em aprendizado de máquina para avaliar o desempenho de

modelos preditivos, especialmente em conjuntos de dados de pequeno porte. O modelo é treinado com os dados disponíveis e, em seguida, testado na amostra excluída. Esse processo é repetido até que cada amostra tenha sido utilizada uma vez como conjunto de teste.

Essa abordagem assegura que o modelo seja avaliado de forma exaustiva e individualizada, fornecendo uma estimativa robusta de seu desempenho, minimizando o viés e garantindo que todas as observações sejam incluídas no treinamento em algumas iterações (rodadas) e na validação em outra, mas nunca ao mesmo tempo. O número de iterações é proporcional ao número de compostos no conjunto de dados e o resultado estatístico é dado pela média de todas as iterações considerando os valores preditos.

4.1.4.2 Modelos de QSAR da camada 2

Na etapa de modelagem e predição de atividade *in vivo* da camada 2, utilizou-se uma abordagem baseada em algoritmos de aprendizado de máquina, especificamente *k-Nearest Neighbors* e *Random Forest*, para avaliar a atividade dos compostos em relação aos receptores de androgênio e à atividade estrogênica. A modelagem foi realizada utilizando descritores biológicos combinados com descritores moleculares ECFP4, que representam as características estruturais dos compostos e suas respostas biológicas previstas pelo modelo multitarefa.

Para a implementação do algoritmo *kNN*, foram ajustados vários hiperparâmetros importantes. O número de vizinhos (*n_neighbors*) foi variado entre 3, 5, 7 e 9, afetando diretamente a decisão de classificação com base na proximidade dos pontos de dados. O método de ponderação (*weights*) foi configurado para ser "uniforme" ou "distância", o que determina se todos os vizinhos têm o mesmo peso na decisão de classificação ou se o peso é inversamente proporcional à distância. A métrica de distância (*metric*), que pode ser "euclidiana", "manhattan", "chebyshev" ou "minkowski", define a forma como as distâncias entre os pontos são calculadas, influenciando a similaridade entre os compostos.

No caso do algoritmo RF, foram ajustados parâmetros cruciais para otimizar o desempenho do modelo. O número de árvores na floresta (*n_estimators*) foi testado

em diferentes valores para melhorar a precisão da predição, enquanto a profundidade máxima das árvores (`max_depth`) foi variada para controlar o nível de complexidade das árvores de decisão. Além disso, o número mínimo de amostras necessárias para dividir um nó (`min_samples_split`) foi ajustado para garantir que a divisão dos nós não fosse excessiva, evitando o sobreajuste do modelo.

A escolha dos melhores hiperparâmetros para ambos os modelos foi realizada através de otimização bayesiana, que permite encontrar a combinação ideal de parâmetros que maximiza a performance dos algoritmos.

4.1.4.3 Avaliação estatística

Realizou-se a avaliação do desempenho estatístico por meio de cálculos de diversas métricas, incluindo ACC (exatidão), recall (sensibilidade), F1-score, exatidão balanceado (bACC), e a área sob a curva ROC (ROC AUC). A ROC AUC representa a capacidade do modelo de distinguir entre classes positivas e negativas. É a integral da curva ROC, que é o gráfico da taxa de verdadeiros positivos versus taxa de falsos positivos. Essas métricas fornecem uma visão abrangente sobre a eficácia dos modelos em classificar corretamente os compostos quanto à sua atividade biológica.

4.1.5 Domínio de aplicabilidade

O domínio de aplicabilidade (DA) do modelo foi determinado com base na análise da distância euclidiana média entre cada molécula do conjunto de teste e seus k vizinhos mais próximos no conjunto de treinamento.

Inicialmente, as representações moleculares foram geradas na forma de impressões digitais baseadas no algoritmo Morgan Fingerprints. Em seguida, o conjunto de treinamento foi utilizado para construir um espaço químico de referência, no qual foi aplicado o algoritmo k NN, utilizando $k=5$. A distância euclidiana média (d_i) de cada molécula do conjunto de teste em relação aos seus k vizinhos mais próximos do conjunto de treinamento foi calculada.

O limite do domínio de aplicabilidade foi definido como o percentil 95 (P_{95}) da distribuição dessas distâncias no conjunto de teste. Assim, uma molécula do conjunto

de teste foi considerada dentro do DA se sua distância média estivesse abaixo ou igual a esse limite, conforme a Equação 15:

$$DA_{kNN} = \begin{cases} 1, & di \leq P_{95} \\ 0, & di > P_{95} \end{cases} \text{ (Equação 15)}$$

Onde DA_{kNN} indica se a molécula pertence ao domínio de aplicabilidade (1 para dentro, 0 para fora), di é a distância média aos k vizinhos mais próximos do conjunto de treinamento, e P_{95} representa o limiar estabelecido pelo percentil 95 da distribuição dessas distâncias. Dessa forma, as moléculas do conjunto de teste que apresentaram $di > P_{95}$ foram classificadas como fora do DA, indicando que suas previsões possuem menor confiabilidade devido à falta de representatividade no espaço químico definido pelo conjunto de treinamento.

4.1.6 Interpretação mecanística

A interpretação mecanística foi realizada e avaliada seguindo os valores *SHapley Additive exPlanations* (SHAP) de acordo com protocolos estabelecidos por (LUNDBERG; LEE, 2017; RODRÍGUEZ-PÉREZ; BAJORATH, 2020). Esse método foi adaptado para modelos de classificação da camada 2 utilizando a abordagem SHAP do kernel independente do modelo. Múltiplas visualizações do SHAP foram combinadas para interpretação comparativa das previsões do modelo.

5.1 PREPARO E PADRONIZAÇÃO DO CONJUNTO DE DADOS

Os DEs interferem em múltiplos *endpoints* independentes. Dentre eles os que são associados à toxicidade reprodutiva feminina e masculina, como um dos alvos sendo alterações em órgãos e tecidos ocasionados pela interação com RE e RA, respectivamente. Inicialmente, foram coletados dados de bioensaios *in vitro* e *in vivo* a partir das bases de dados da EPA ToxCast e Tox21 (RICHARD et al., 2016, 2021). Esse processo resultou em uma matriz esparsa com 8.156 compostos com atividade reportada para pelo menos um dos 46 ensaios pertencentes às vias de efeitos adversos de RA e RE. Após um extensivo e rigoroso processo de preparo dos dados e análise de duplicadas, cerca de 7.956 compostos permaneceram no conjunto de dados para geração de modelos de classificação multitarefa de QSAR da camada 1.

Para a camada 2, os ensaios foram subdivididos para avaliação da atividade sobre RA em 101 compostos agonistas e 119 antagonistas dos receptores de androgênio, utilizando o ensaio de *Hershberger*, e 106 compostos com atividade reportada para RE, através dos ensaios uterotróficos. Todos os ensaios foram obtidos das bases de dados Tox21/ToxCast.

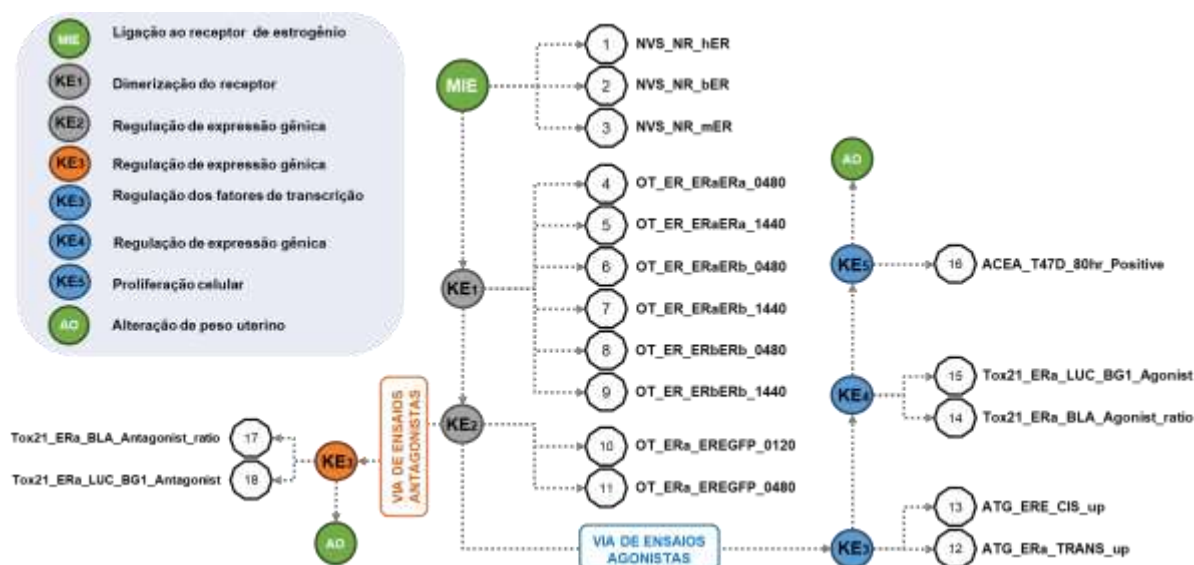
5.1.1 Desregulação endócrina mediada por receptor de estrogênio

Em relação à atividade sobre o RE para avaliar potencial desregulação endócrina em organismos femininos, foram selecionados 26 ensaios *in vitro* e 1 ensaio *in vivo*, focados na atividade dos receptores de estrogênio α/β (RE α/β) que compreendem à AOP de desregulação endócrina. Esses ensaios foram esquematizados na Figura 8, onde elucida toda a via de efeito adverso relacionado ao RE e os respectivos ensaios em cada etapa. Foram incluídos testes para identificar a ligação direta de compostos aos receptores em diferentes espécies, como humano, camundongo e bovino, representados pelos ensaios NVS_NR_hER, NVS_NR_mERA e NVS_NR_bER, respectivamente. Esses ensaios focam no MIE da via de DE, que é a interação direta dos compostos com os receptores.

Adicionalmente, os ensaios que refletem os KEs subsequentes incluem a série OT que mede a interação entre diferentes formas do RE. Essa interação é crucial para a ativação dos receptores e a subsequente regulação dos genes-alvo. Esses ensaios

são denominados OT_ER_ERaERa_0480, OT_ER_ERaERa_1440, OT_ER_ERaERb_0480, OT_ER_ERaERb_1440, OT_ER_ERbERb_0480, OT_ER_ERbERb_1440, onde os números indicam o tempo de leitura do ensaio em minutos. No que se refere aos ensaios ATG_ERa_TRANS e ATG_ERE_CIS, estes são utilizados, respectivamente, para medir a atividade de transativação do receptor de estrogênio alfa (RE α) e a capacidade de interação com EREs, que regulam a expressão gênica. A base de dados Tox21 disponibilizou ensaios específicos para medir a atividade agonista ou antagonista de compostos em relação ao RE α , utilizando sistemas repórteres baseados em beta-lactamase (BLA) e luciferase (LUC). Esses ensaios são identificados como Tox21_ERa_BLA_BG1_Agonist, Tox21_ERa_LUC_BG1_Agonist e Tox21_ERa_BLA_Antagonist. Além disso, o ensaio ACEA_ER_80hr foi incluído para medir a resposta do RE ao longo de um período de 80 horas.

Figura 8: Esquemática da Via de Efeito Adverso relacionada ao receptor de estrogênio.

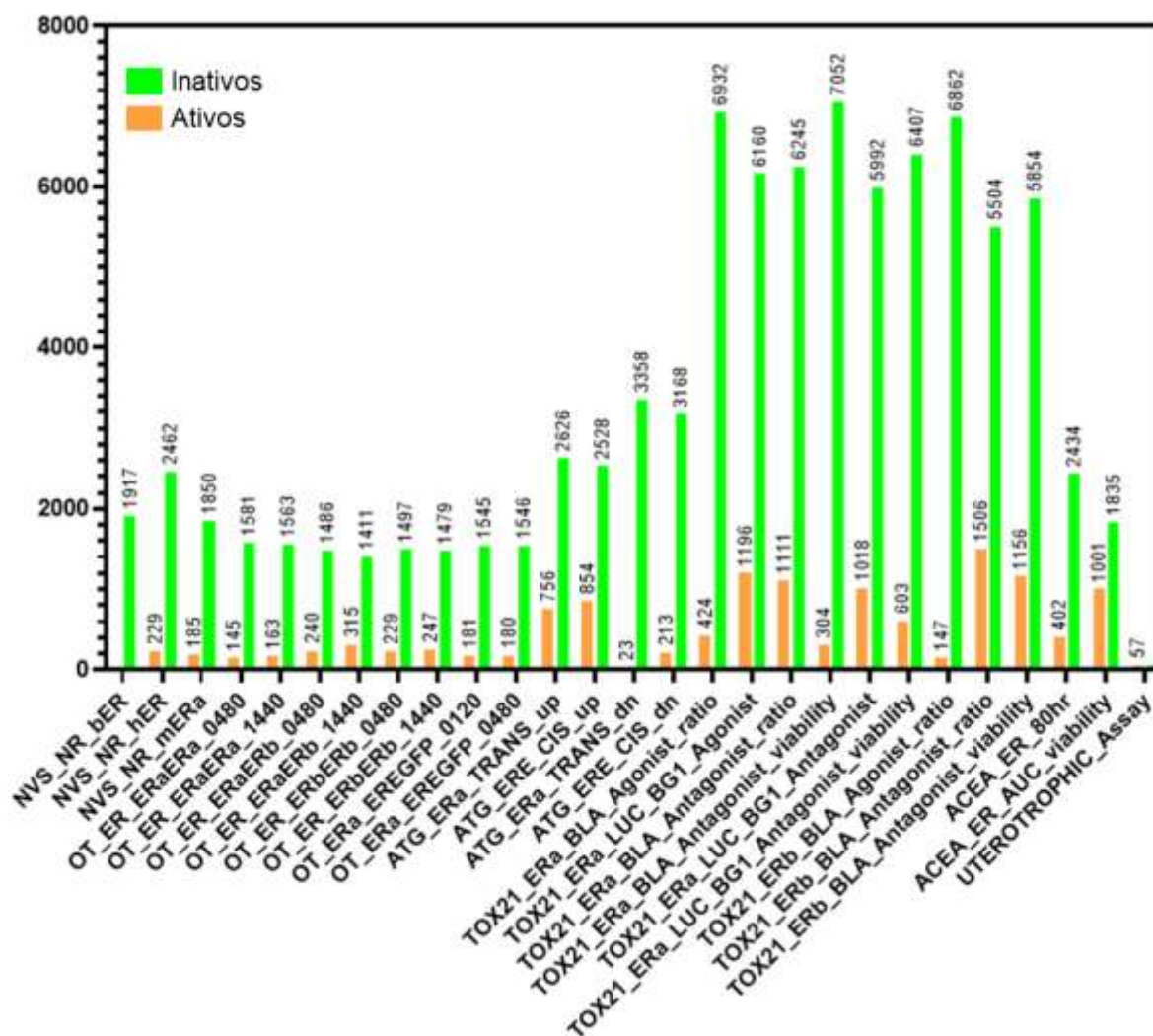


Adaptado de Judson et al. (2015).

Como desfecho final (AO) da AOP relacionada aos REs, o bioensaio uterotrófico foi escolhido por conseguir avaliar o potencial de aumento de peso no útero de camundongos. Dos 106 compostos testados para o AO feminino, 57 foram considerados ativos e 49 como inativos. A Figura 9 elucida os bioensaios e a quantidade de compostos utilizados para construção do modelo de QSAR, elucidando

um desbalançamento entre a quantidade de compostos ativos (tóxicos) e inativos (não tóxicos).

Figura 9: Gráfico do preparo do conjunto de dados e quantidade de compostos para cada um dos ensaios relacionados ao receptor de estrogênio.

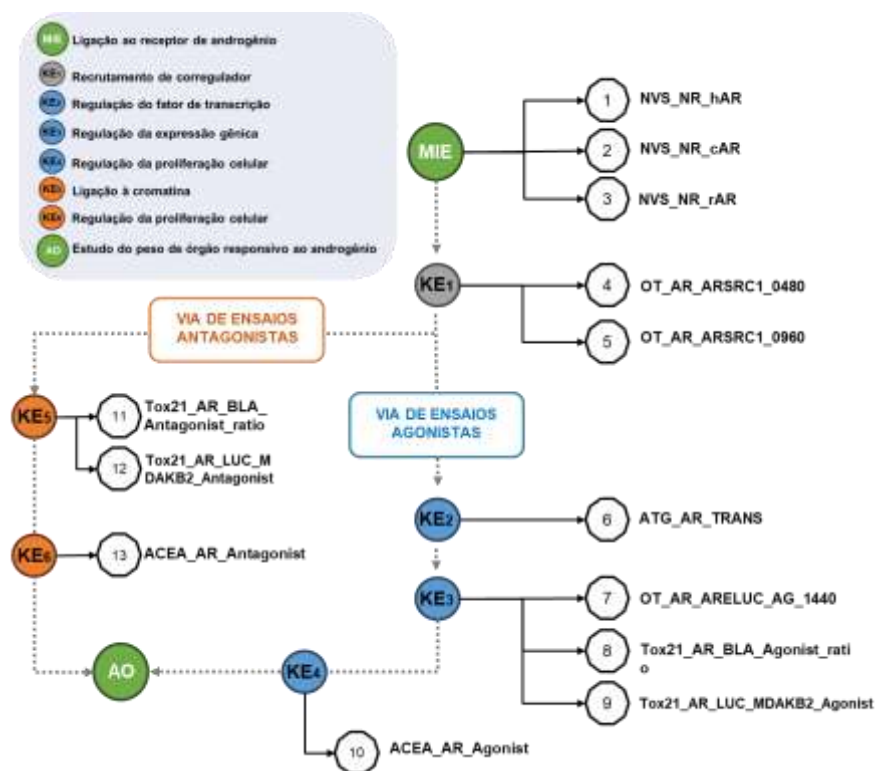


5.1.2 Desregulação endócrina mediada por receptor de androgênio

Os bioensaios específicos para os receptores de androgênio incluíram NVS_NR_cAR, NVS_NR_rAR e NVS_NR_hAR, que medem a ligação direta de compostos aos RAs de chimpanzé (*Pan troglodytes*), camundongos (*Rattus norvegicus*) e humanos (*Homo sapiens*), respectivamente. Esses ensaios, sumarizados na Figura 10, são cruciais para avaliar o evento molecular inicial na via de desregulação endócrina. Outros ensaios, como OT_AR_ARSRC1_0480,

OT_AR_ARSRC1_0960 e OT_AR_ARELUC_AG_1440, focam na interação do RA com seus cofatores ou na ativação do receptor, o que é fundamental para a modulação dos genes-alvo. O tempo de leitura dos ensaios é indicado pelos números (0480, 0960, 1440), correspondendo aos minutos após a exposição ao composto (JUDSON et al., 2020).

Figura 10: Esquematização da Via de Efeito Adverso relacionada ao receptor de androgênio.



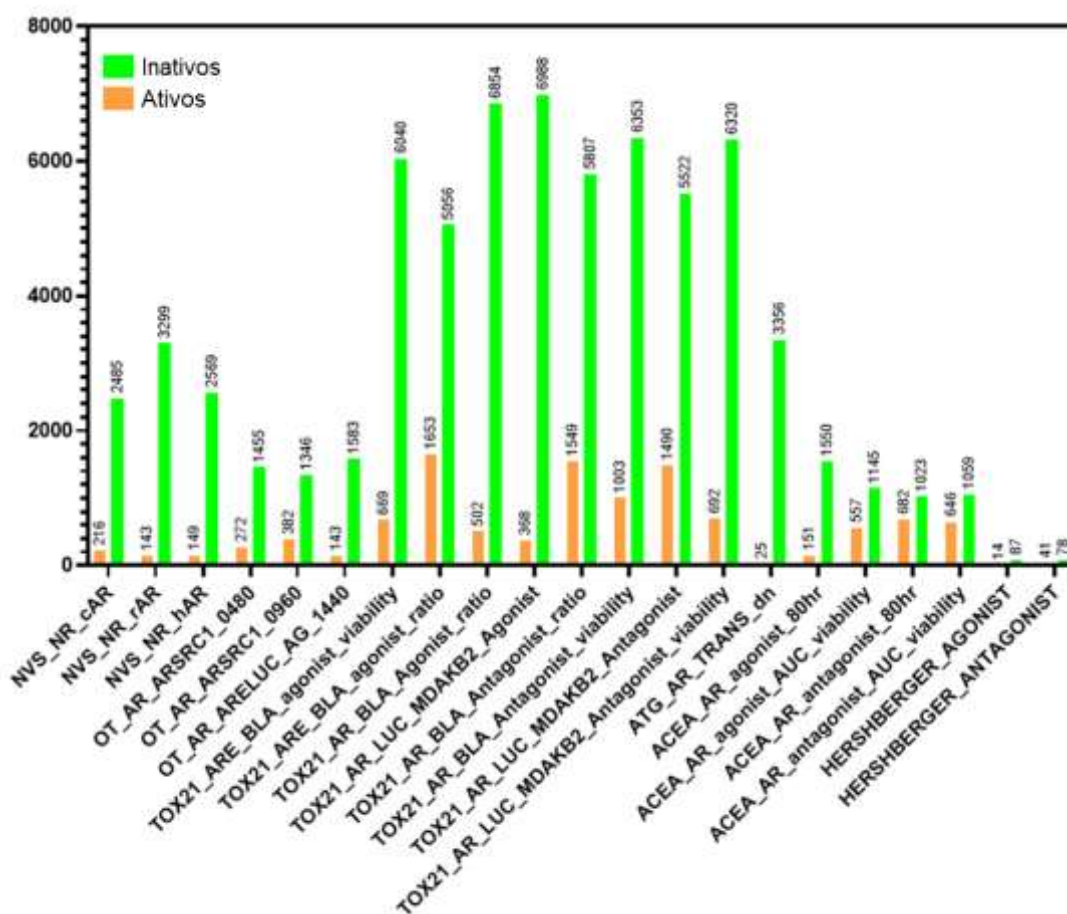
Adaptado de Kleinstreuer et al. (2017).

No contexto da avaliação da atividade agonista e antagonista dos RAs, os ensaios TOX21_ARE_BLA_agonist_viability, TOX21_ARE_BLA_agonist_ratio, TOX21_AR_BLA_Agonist_ratio e TOX21_AR_LUC_MDAKB2_Agonist foram empregados para determinar o potencial agonista dos compostos em diferentes sistemas celulares. Por outro lado, os ensaios TOX21_AR_BLA_Antagonist_ratio, TOX21_AR_BLA_Antagonist_viability, TOX21_AR_LUC_MDAKB2_Antagonist e TOX21_AR_LUC_MDAKB2_Antagonist_viability foram utilizados para avaliar o efeito antagonista, observando tanto a resposta do receptor quanto a viabilidade celular.

Além disso, os ensaios ATG_AR_TRANS_dn e ACEA_AR_agonist_80hr, ACEA_AR_agonist_AUC_viability e ACEA_AR_antagonist_80hr também foram incluídos na análise, permitindo uma visão mais abrangente da dinâmica de ativação e viabilidade celular em resposta à estimulação ou inibição do RA ao longo do tempo.

Ao que se refere a última etapa da AOP para os RAs, o ensaio de *Hershberger* foi considerado como o AO. Coletamos 101 compostos com efeitos agonistas dos quais 14 se mostraram ativos e 87 inativos. Já os dados antagonistas, coletamos cerca de 119 compostos dos quais 41 deles apresentaram propriedades ativas. Todos os ensaios que compuseram a AOP relacionada aos RAs desse trabalho foram ilustrados na Figura 11, comparando a quantidade de compostos ativos com a quantidade de compostos inativos de cada uma das tarefas.

Figura 11: Gráfico do preparo do conjunto de dados e proporção de compostos para cada um dos ensaios relacionados ao receptor de androgênio.



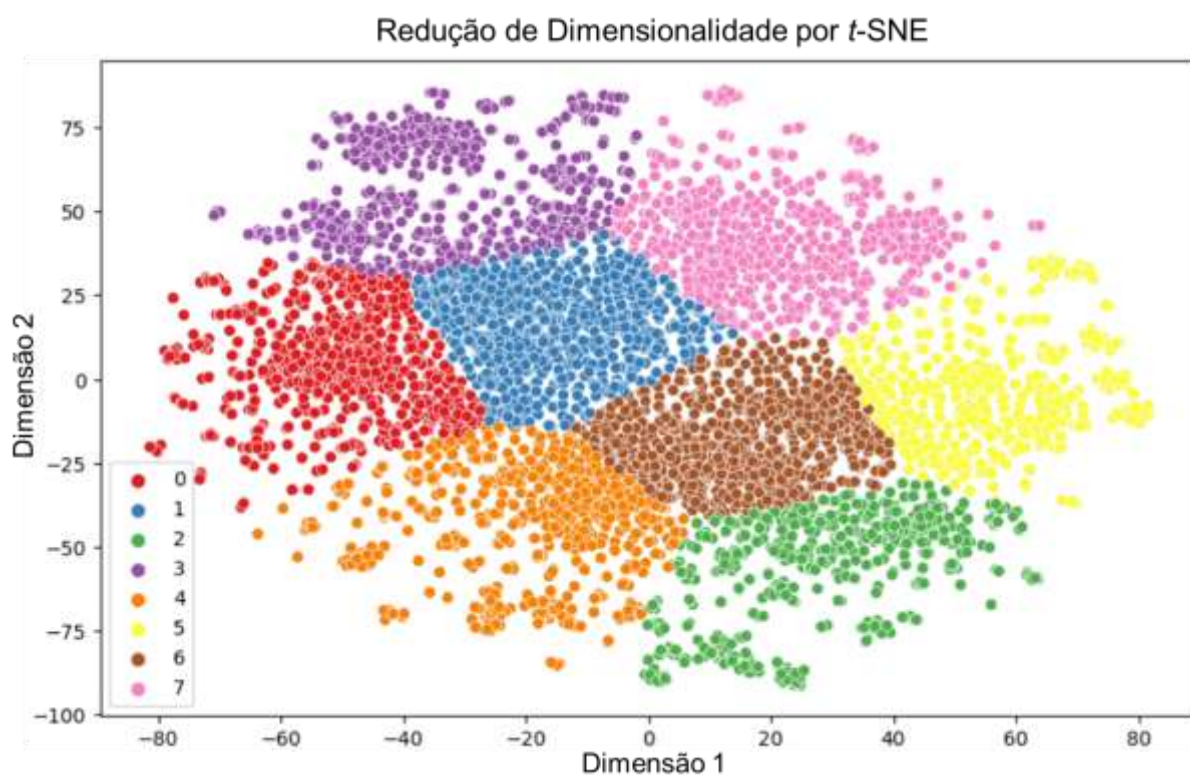
5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS

5.2.1 Análise de similaridade química

A análise dos determinantes estruturais para a toxicidade mediada por DEs foi conduzida ao nível de arcabouços do tipo Bemis-Murcko, conforme representado na Figura 12. A aplicação da técnica de redução de dimensionalidade por *t*-SNE permitiu visualizar a organização do espaço químico, revelando agrupamentos estruturais bem definidos. Os compostos foram organizados em oito grupos distintos, como determinado pela pontuação de silhueta, que apresentou um valor de 0,35, sugerindo uma divisão moderadamente consistente, refletindo a diversidade estrutural do conjunto de dados analisado.

É importante ressaltar que a pontuação de silhueta igual 0,35 indica que, embora a segmentação seja consistente, ainda há uma sobreposição considerável entre alguns grupos, o que pode ser um reflexo da complexidade inerente aos DEs, que muitas vezes exibem efeitos multi-receptores. Isso ressalta a importância de continuar refinando os algoritmos de ML para melhorar a precisão preditiva e a especificidade dos modelos.

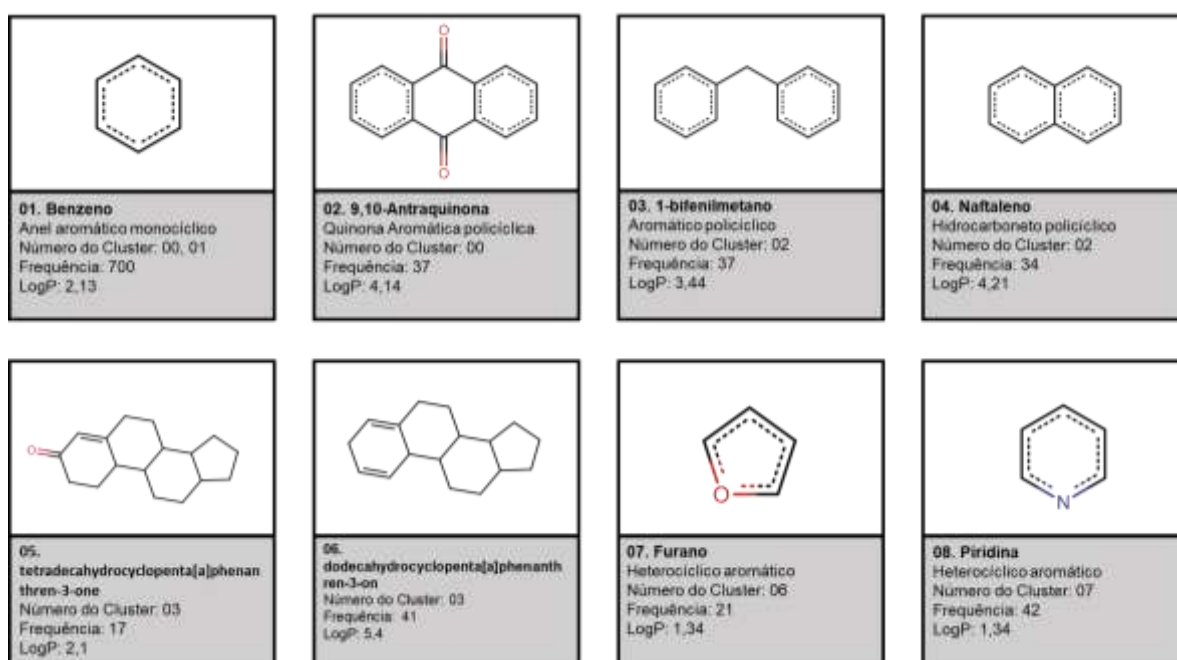
Figura 12: Visualização dos dados através do *t*-SNE relacionando as estruturas dos arcabouços moleculares por meio de clusters.



Esses agrupamentos mostraram-se particularmente informativos para a análise de DEs, uma vez que compostos com propriedades químicas semelhantes tendem a exibir comportamentos toxicológicos correlacionados. Dentro de cada cluster, observou-se uma prevalência de *scaffolds* que já foram associados a atividades disruptores de receptores hormonais, como os REs e RAs, o que sugere que a arquitetura molecular desempenha um papel central na predição de efeitos tóxicos relacionados à desregulação endócrina.

A análise de *scaffolds*, conforme mostrado na Figura 13, revelou que os clusters 1, 2 e 3 continham os arcabouços mais frequentes entre os compostos analisados, apresentando semelhanças estruturais com compostos previamente identificados como DEs. Essas estruturas são relevantes devido à sua propensão em interagir com receptores hormonais, contribuindo para a desregulação do sistema endócrino.

Figura 13: Principais arcabouços moleculares detectados em cada um dos oito clusters.



No Cluster 0, por exemplo, os *scaffolds* mais frequentes incluem a estrutura cíclica simples N° 01 (220 ocorrências) e estruturas mais complexas como N° 02. Esses compostos frequentemente se assemelham a anéis aromáticos e quinonas, comumente encontrados em substâncias que interagem com receptores de estrogênio. Estudos anteriores indicam que essas estruturas cíclicas aromáticas são altamente associadas à mimetização ou bloqueio de hormônios naturais, o que reforça

seu potencial de desregulação endócrina (PANDIT; SINGH; PARTHASARATHI, 2022; YU et al., 2023).

No Cluster 1, observou-se uma prevalência significativa do *scaffold* benzeno (480 ocorrências), que mais uma vez destaca a importância de estruturas aromáticas em EDCs. Além disso, outras estruturas complexas, como N° 03 e N° 04, foram identificadas, indicando que o modelo identificou corretamente compostos com potencial para interferir na sinalização hormonal via receptores de androgênio e estrogênio. A presença dessas estruturas é particularmente relevante para a identificação de substâncias com efeitos multissistêmicos (DEY et al., 2021; RAYSYAN et al., 2023).

O Cluster 3 apresentou um padrão distinto, com *scaffolds* mais complexos, como N° 05 e N° 06, que estão associados a compostos esteroides com interações múltiplas em diferentes vias hormonais (KALETA et al., 2024; WEI et al., 2020). Essas estruturas indicam uma diversidade funcional e química significativa, o que pode refletir a capacidade desses compostos de atuar em múltiplos receptores endócrinos, tanto estrogênicos quanto androgênicos.

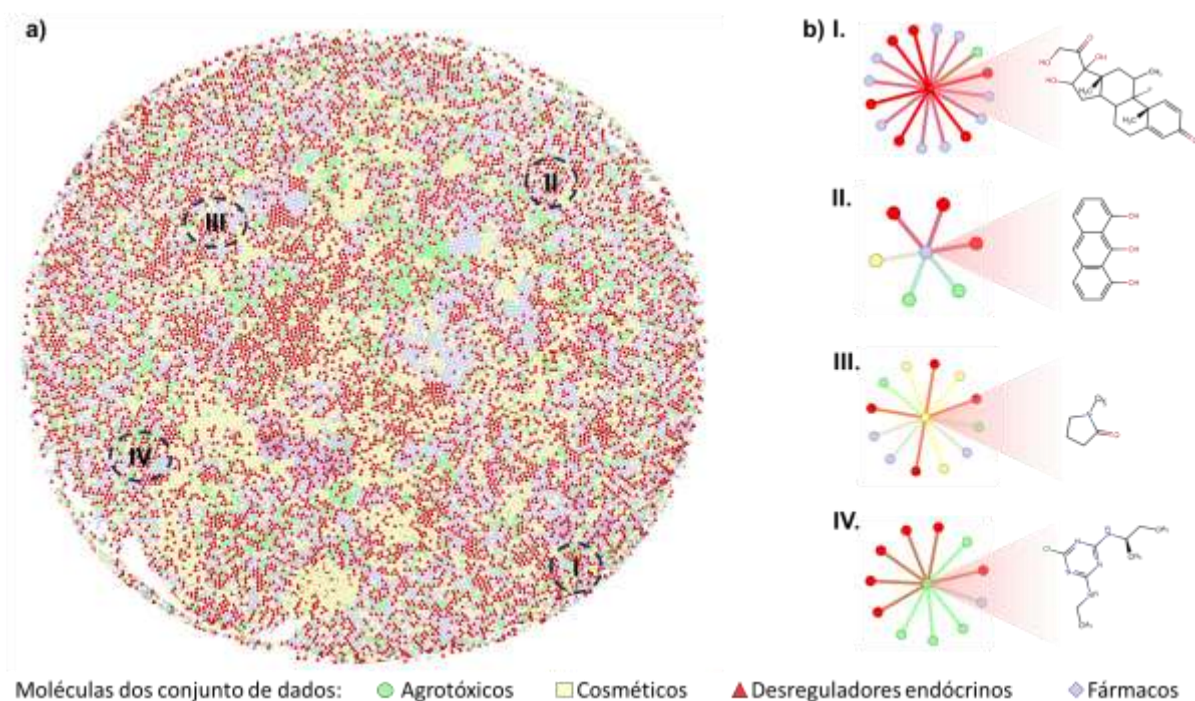
Ao observar os principais arcabouços moleculares e tendo em vista sua complexidade estrutural, a identificação dessas estruturas como no Cluster 3 e com base nos princípios da Química Verde é possível utilizar as informações dos *scaffolds* para projetar compostos com menor persistência e bioacumulação (GANESH et al., 2021). Na identificação de compostos com propriedades molecular, o estudo dos *scaffolds* permite a visualização posterior e estudo de estratégias que visem a redução de características quanto à persistência e bioacumulação dos compostos, um exemplo é a simplificação molecular (WANG; DONG; SHENG, 2019). Essa estratégia é utilizada para otimizar a molécula e reduzir seu potencial de desregulação endócrina.

Esses achados corroboram a eficácia da modelagem com *t*-SNE e K-means na separação e identificação de padrões estruturais correlacionados à atividade endócrina adversa. A redução dimensional permitiu a visualização clara da diversidade estrutural presente no conjunto de dados, facilitando a identificação de *scaffolds* com relevância biológica no contexto da desregulação hormonal. A presença dominante de anéis aromáticos e estruturas conjugadas entre os *scaffolds* destaca o

potencial dos compostos analisados para atuar como DEs, corroborando com achados da literatura.

Outra análise de similaridade entre as estruturas químicas foi realizada utilizando o programa DataWarrior v06.04.01, conforme ilustrado na Figura 14a. Diferentemente da abordagem anterior, que empregou arcabouços moleculares, essa análise considerou diretamente as estruturas das moléculas presentes no conjunto de dados e de dados sobre excipientes em cosméticos, fármacos no mercado e agrotóxicos. Nesse sentido, pode-se observar que as moléculas presentes nos conjuntos de DEs são similares e cobrem uma vasta área do conjunto total de moléculas.

Figura 14: Análise de similaridade entre as estruturas químicas evidenciando o mapa de similaridade **(a)** e o Neighbor Tree das moléculas vizinhas **(b)** com exemplos das estruturas químicas: **I)** 9-fluoro-11,16,17-trihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one; **II)** anthracene-1,8,9-triol; **III)** 1-methylpyrrolidin-2-one; e **IV)** 2-N-[(2S)-butan-2-yl]-6-chloro-4-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine



A Figura 14b evidencia o *Neighbor Tree* que permite visualizar uma estrutura de dados otimizada para a busca de vizinhos próximos de moléculas similares com base no coeficiente de tanimoto ($\geq 80\%$ de similaridade) a partir de fragmentos dos

descritores moleculares. Os compostos I, II, III e IV foram selecionados de forma randomizada para evidenciar estruturas químicas presentes e relação com estruturas de fármacos, excipientes de cosméticos e agrotóxicos.

O domínio de aplicabilidade de um modelo é determinado pelo conjunto de dados utilizado para sua construção. Quanto maior a diversidade estrutural das moléculas, maior a abrangência do domínio de aplicação do modelo (SAPOUNIDOU; NORINDER; ANDERSSON, 2022; ALVES et al., 2018). Para avaliar esse domínio nos modelos gerados, realizamos uma análise de sobreposição do espaço químico com bases de dados contendo ingredientes cosméticos, fármacos e agrotóxicos, conforme descrito por Alves et al. (2018).

5.2.2 Mapa de correlação entre os dados

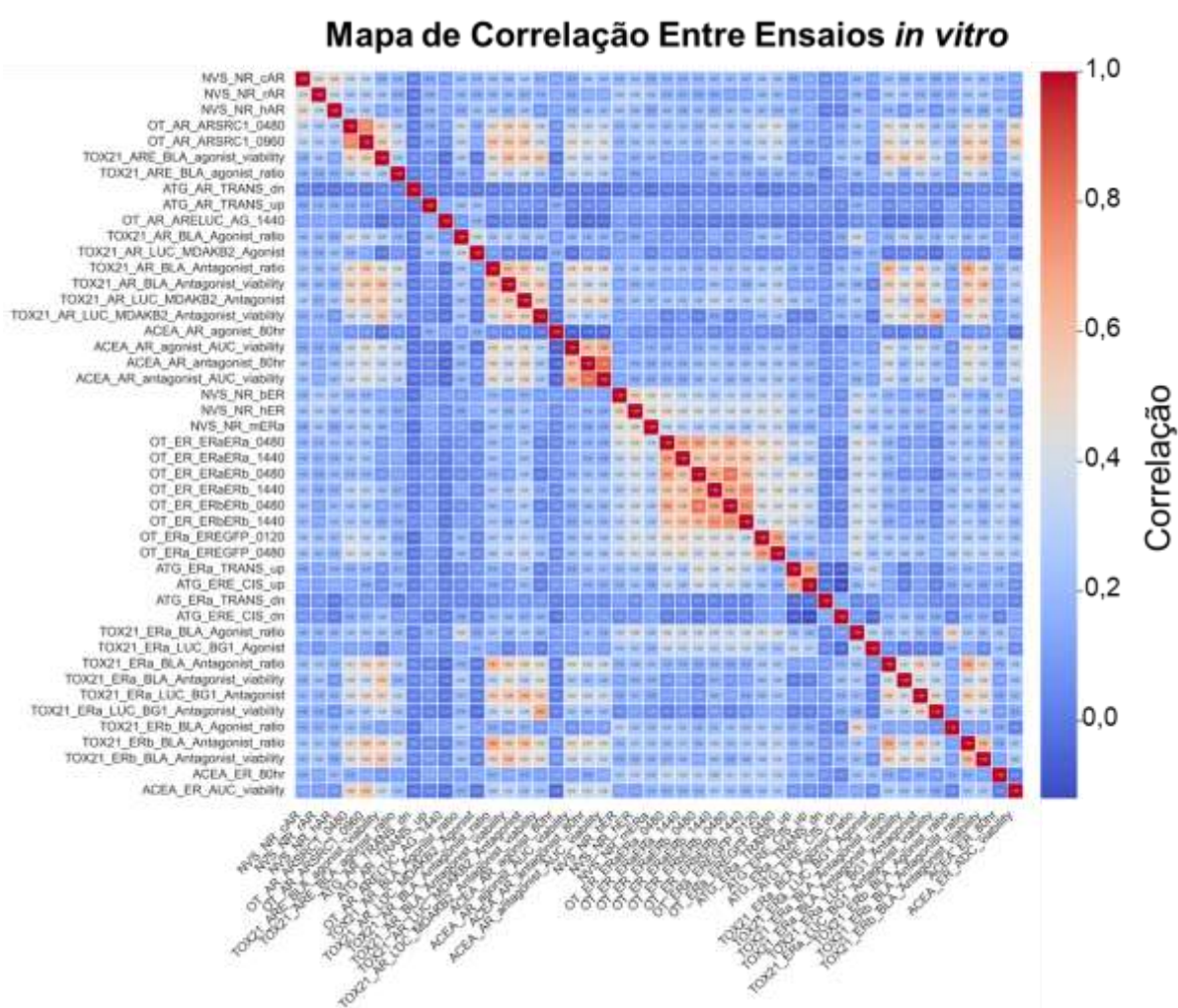
Como etapa preliminar do projeto, fizemos análises descritivas dos dados com múltiplas ferramentas para analisar e avaliar o conjunto de dados utilizado. A Figura 15 evidencia o mapa de calor de similaridade fornecendo uma visão geral da correlação entre os subconjuntos de dados do modelo representado por tonalidades de azul ao vermelho que variam conforme o coeficiente de correlação de Pearson aumenta, respectivamente.

Essa ferramenta permite a análise da correlação entre os ensaios presentes no conjunto de dados, mostrando como eles se relacionam em termos de atividade e inatividade. Ele é útil para identificar redundâncias, se os ensaios estão fornecendo informações sobre o mesmo mecanismo ou se há compostos similares para atividades em ambos ensaios. Observa-se que os dados apresentam uma correlação que varia de 0,3 a 0,5 na maioria dos dados, entretanto a grupamentos evidenciados pelo mapa de calor que apresentam correlação $\geq 0,6$. Esses grupamentos evidenciados na figura ilustraram que determinados eventos chaves entre as tarefas masculinas e femininas possuem correlação, como, por exemplo, as atividades sobre os receptores e os ensaios da OT.

Embora os AOPs relacionados aos REs e RAs representam alvos e mecanismos distintos e possam ser considerados desfechos toxicológicos independentes, algumas classes de substâncias apresentam atividades estrogênicas

e antiandrogênicas, indicando efeitos pleiotrópicos (KOJIMA et al., 2004, p. 200). Os ensaios com alta correlação ($\geq 0,6$) são sugestivos que os ensaios estão fortemente interligados. Essa informação é relevante para a modelagem *multitask*, pois permite explorar padrões compartilhados sem perder de vista as diferenças mecânicas entre as tarefas. Já correlações baixas, quando associadas a alta importância no modelo QSAR, podem refletir interações não lineares ou efeitos específicos não capturados por análises puramente lineares.

Figura 15: Mapa de correlação de calor entre os subconjuntos de dados para ensaios relacionados aos AOPs do receptor de estrógeno e andrógeno.

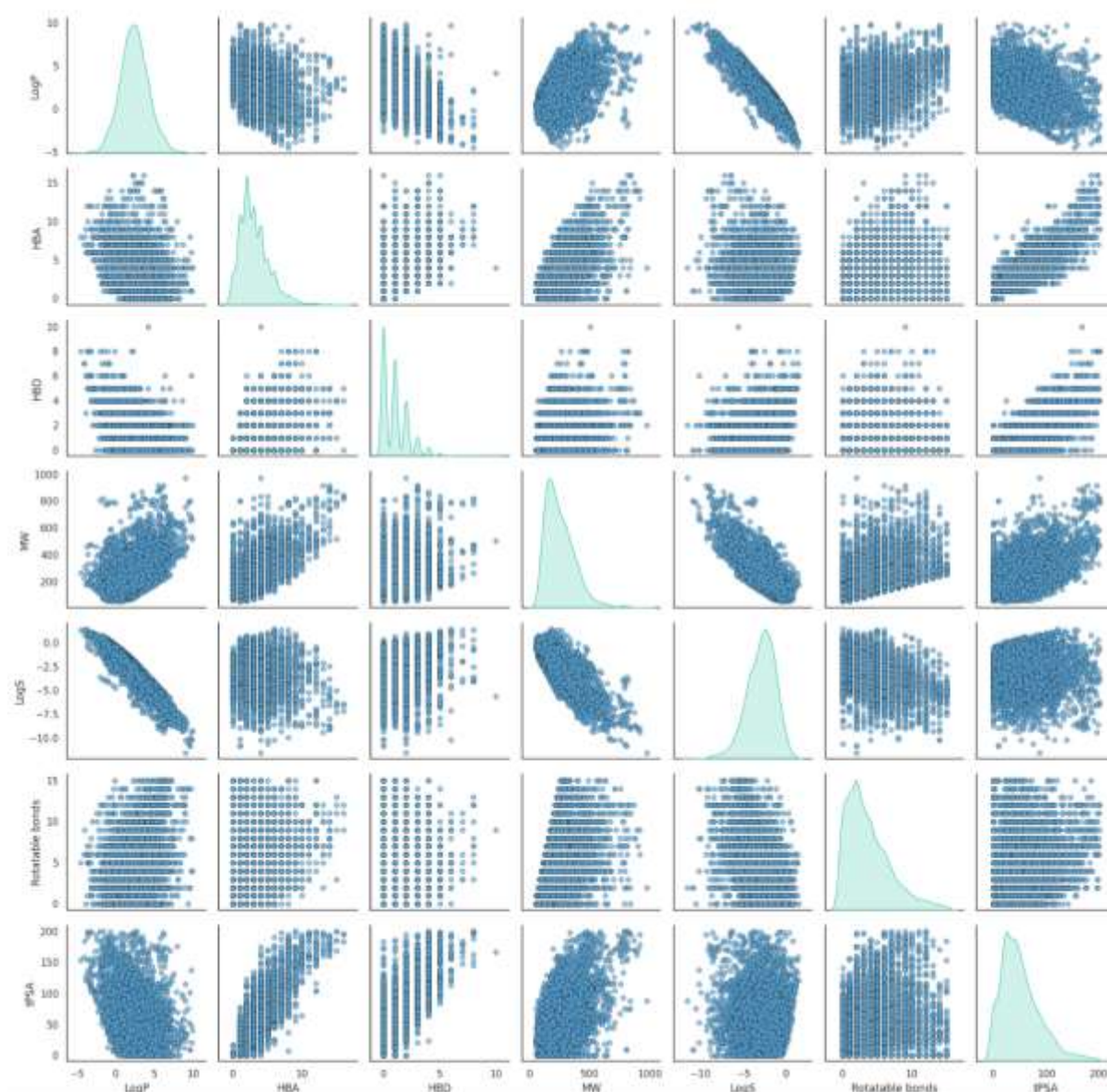


5.2.3 Propriedades físico-químicas dos conjuntos de dados

Estudamos também as possíveis diferenças entre as propriedades físico-químicas e suas correlações entre cada propriedade dos nossos conjuntos de dados.

A Figura 16 mostra o resumo dos gráficos de densidade e dispersão, evidenciado as propriedades de peso molecular dos compostos (MW), número de receptores de ligação de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligações de hidrogênio (HB), ligações rotacionáveis (*Rotatable Bonds*), área de superfície de polaridade topológica (TPSA), coeficiente de partição octanol/água (LogP) e a solubilidade estimada (LogS).

Figura 16: Matriz de dispersão das propriedades físico-químicas do conjunto de dados *in vitro*.



Os estudos das propriedades físico-químicas são relevantes tanto para toxicologia no âmbito da saúde dos organismos, quanto para a toxicologia ambiental. A distribuição dos valores de *cLogP* na faixa de 2 a 6 confirma a natureza lipofílica

dos compostos, como por exemplo dos agrotóxicos DDT, os torna mais facilmente a serem absorvidos nas células devido aos componentes lipofílicos na membrana celular (EBSA et al., 2024). Os efeitos tóxicos dos compostos dependem se eles alcançam ou permanecem no sítio de ação.

Além disso, a diversidade no peso molecular dos conjuntos de dados demonstra a complexidade de estruturas que possam interferir e serem consideradas como DEs. A classe PFAS compreende substâncias distintas com estruturas e propriedades muito diferentes, isso resulta em substâncias com diferentes em termos de MW, da mesma forma que apresentam substâncias com lipofilicidade e hidrossolubilidade diferentes que instiga a sugestão de que alguns PFAS são móveis e outros imóveis no ambiente, e alguns se acumulam enquanto outros não (COUSINS et al., 2020).

As análises das propriedades físico-químicas não apenas são relevantes para conhecimento do conjunto de dados, como também são fortes aliadas para suposição das propriedades de absorção, distribuição, metabolização, excreção e mecanismo de toxicidade no organismo, os chamados ADMETox, como também se referem as propriedades de persistência e bioacumulação no ambiente.

5.3 MODELO DE CAMADA 1

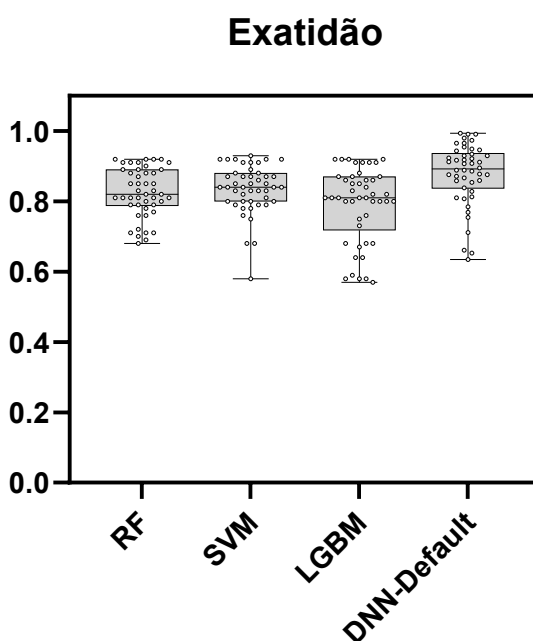
A construção dos modelos de camada 1 começou pelos modelos de tarefa única, também conhecidos como modelos de baseline. Para a geração dos modelos de QSAR de classificação que categorizam atividade e inatividade frente a múltiplos ensaios relacionados à desregulação endócrina, calculamos descritores moleculares e realizamos a divisão dos conjuntos de dados de forma randômica em treinamento e teste, na proporção de 80:20, respectivamente. Em seguida, os modelos foram gerados e validados conforme descrito nos tópicos anteriores.

Os modelos de QSAR foram desenvolvidos utilizando os algoritmos RF, SVM e LGBM. Os descritores moleculares do tipo ECFP, com diferentes valores de raio e número de *bits*, foram calculados. Com base nos resultados estatísticos e análise manual, selecionamos o raio 2 e 2048 *bits* como parâmetros ideais para os modelos baseline, aplicados aos múltiplos ensaios. Para todos os modelos de tarefa única, utilizamos o comando “*BayesSearchCV*” para realizar a busca otimizada de melhores

hiperparâmetros nos modelos de aprendizado de máquina (ML). A partir da Otimização Bayesiana realizada pelo comando, os modelos foram ajustados com base nas iterações anteriores, explorando as regiões mais promissoras do espaço de cada um dos hiperparâmetros.

Os resultados apresentados na Figura 17, que inclui gráfico de ACC reflete o desempenho dos modelos de classificação ao avaliar os dados dos bioensaios relacionados aos RAs e REs. De modo geral, os modelos RF, SVM e LGBM apresentaram desempenhos relativamente próximos quanto a ACC, respectivamente, 0,82; 0,83 e 0,79. Enquanto o modelo de multitarefa de rede neural profunda (DNN, *deep neural network*), ao qual intitulamos de “DNN-Default”, apresentou resultado superior aos demais de 0,88.

Figura 17: Performance da exatidão (ACC) do conjunto teste dos modelos matemáticos.

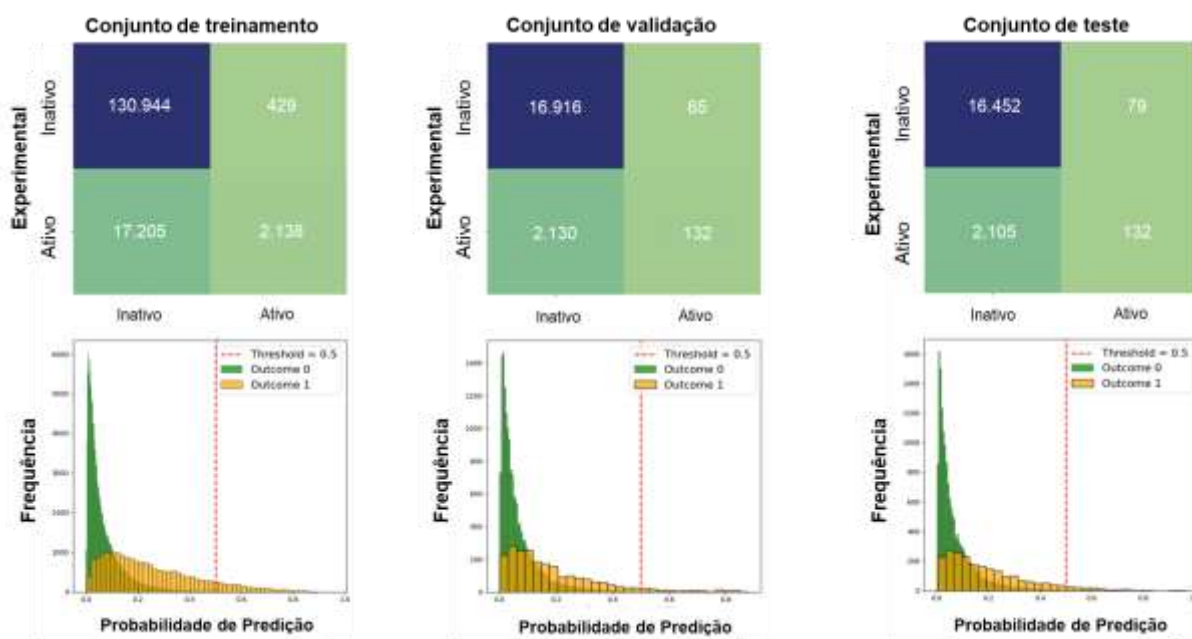


Nos 46 modelos de classificação DNN-Default, os desempenhos médios no conjunto de teste foram: ACC (0,88), SE (0,05), SP (0,99), F1 (0,11) e G-Mean (0,24). A Figura 18 apresenta as matrizes de confusão e a distribuição das probabilidades de predição para cada conjunto de dados. As performances estatísticas do DNN-Default citados evidenciam a necessidade de desenvolver abordagens mais avançadas, como

os modelos multitarefa baseados em DNN, capazes de capturar relações complexas entre variáveis e lidar melhor com a variabilidade inerente aos dados toxicológicos.

No conjunto de teste, composto por 16.531 exemplos, 16.452 compostos foram corretamente classificados como não tóxicos (verdadeiros-negativos), enquanto apenas 79 foram classificados incorretamente (falsos-negativos). Por outro lado, os verdadeiros-positivos apresentaram desempenho inferior, com maior número de compostos sendo classificados como falso-negativos. A análise das probabilidades de predição mostrou a distribuição dos compostos positivos (verdes) e negativos (laranja) no eixo Y, em relação à probabilidade de predição no eixo X. Como ilustrado, o limiar de 0,5 foi utilizado para a classificação: compostos com probabilidade abaixo desse valor foram considerados negativos, enquanto aqueles iguais ou superiores a 0,5 foram classificados como ativos.

Figura 18: Performance da matriz de confusão dos modelos de DNN para os três conjuntos de dados e suas respectivas distribuições de probabilidade predita.

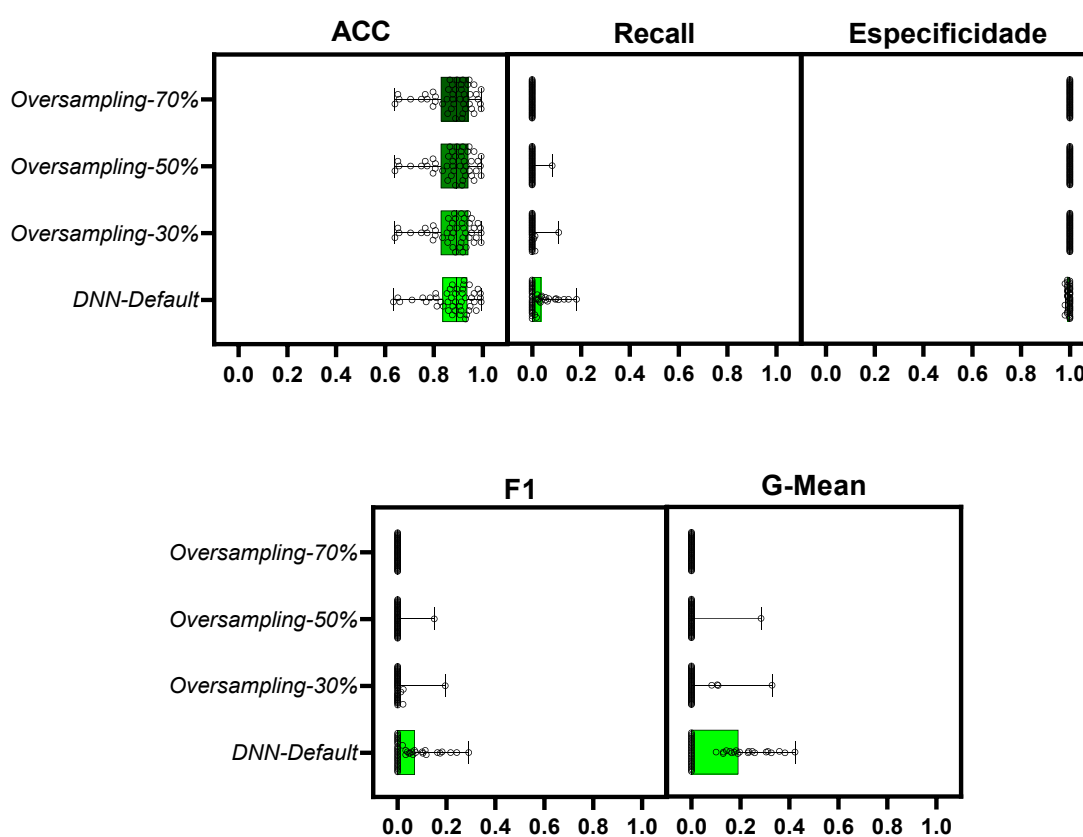


Para mitigar o desbalanceamento entre compostos inativos e ativos, utilizou-se a técnica de superamostragem ADASYN. Essa ferramenta gera novas instâncias da classe minoritária com base nos vizinhos das amostras existentes, ajustando o número de compostos sintéticos de acordo com a densidade dos pontos minoritários. O parâmetro “max_ratio” foi configurado para controlar o grau de aumento da classe

minoritária em relação à classe majoritária, com valores de 0,3; 0,5 e 0,7. Isso significa que o número de compostos ativos foi ampliado para representar 30%, 50% e 70% do número total de compostos inativos.

Conforme indicado nos gráficos ilustrados na Figura 19, que evidenciaram a performance do conjunto teste tanto do modelo gerado sem a técnica de ADASYN, ao qual intitulamos de DNN-Default, quanto os três modelos que apresentaram as instâncias sintéticas denominados de superamostragem 30%, 50% e 70% cada.

Figura 19: Análise comparativa da performance dos modelos de DNN.

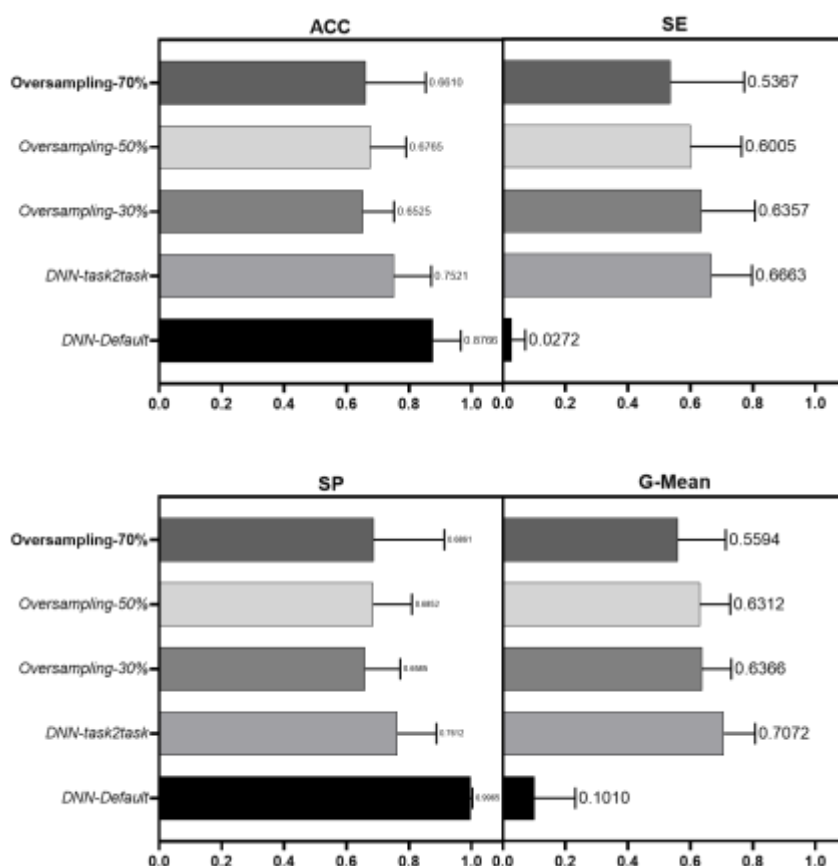


Nossos modelos utilizando a metodologia de superamostragem tiveram performance estatísticas inferiores ao modelo DNN-Default. Além disso, os três modelos também apresentaram o qual os valores médios de ACC (0,88), Recall (0,00), Especificidade (1,00), F1 (0,00) e G-Mean (0,04). Diante desses resultados e da Figura 17, há de se observar que o modelo DNN apresentou distribuição de dados mais dispersa que os modelos gerados com o ADASYN uma vez que a distribuição dos resultados de cada um dos 46 modelos apresentou uma distribuição maior que a

dos modelos e isso resultou nas amostras verdadeiro-positivos sendo identificadas com maior recall que os demais modelos.

Além disso, a metodologia de ajuste de limiar (*threshold moving*) em classificadores probabilísticos e otimizar as métricas de recall, F1 e G-Mean, isto é, para cada um dos modelos gerados foi calculado uma estimativa da probabilidade de uma instância em pertencer a classe de compostos tóxicos ou não tóxicos. A Figura 20 mostra os resultados dos conjuntos testes de cada um dos modelos após a calibração do limiar através do ajuste de limiar.

Figura 20: Performance estatísticas dos conjuntos testes calibrados dos modelos multitarefa.

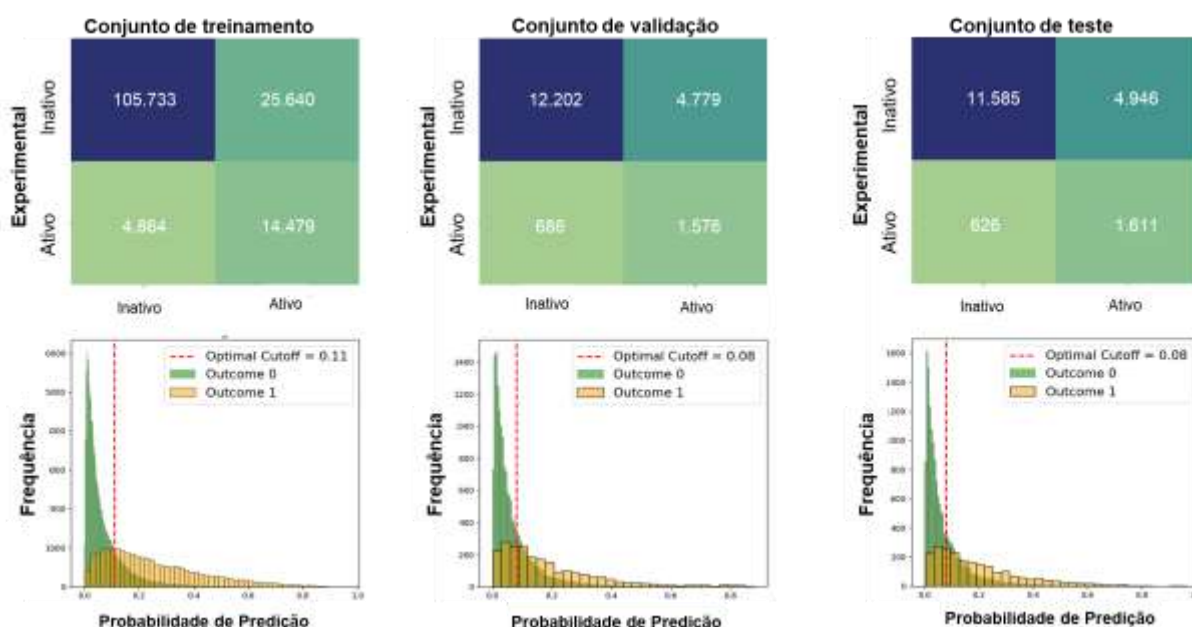


Como elucidado nos gráficos da Figura 18, quando comparado a SE do modelo não calibrado, DNN-Default, com o modelo calibrado, DNN-task2task, nota-se um aumento considerável nas médias, 0,02 para 0,67 respectivamente. Diante dos resultados, é possível inferir que a diferença dos resultados entre os modelos calibrados não apresentou grandes variações. No entanto, foi um método eficaz no

aumento do Recall e G-Mean dos modelos quando comparados com os modelos não calibrados.

A Figura 21 mostra a matriz de confusão e a distribuição de dados do modelo DNN-task2task. Como pode-se observar, houve um aumento considerável na identificação dos compostos verdadeiro-positivos quando comparados aos modelos não calibrados. Ao analisar a distribuição de probabilidade, observa-se que o limiar ajustou as classes para distinguir de maneira mais precisa os compostos tóxicos e não tóxicos quando comparado aos modelos com superamostragem e o modelo DNN-Default.

Figura 21: Performance da matriz de confusão dos modelos de DNN calibrados para os três conjuntos de dados e suas respectivas distribuições de probabilidade predita.



Na toxicologia preditiva, o desempenho do modelo é avaliado ao comparar as previsões com os rótulos experimentais. É possível observar através das matrizes de confusão presentes na Figura 18 e Figura 21 elucidando a taxa de compostos preditos como verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos. Nossa estratégia de calibração do limiar elucidou o aumento nos compostos verdadeiro-positivo do modelo DNN-Default ao modelo DNN-task2task, elevando as métricas no segundo modelo recall e G-Mean para $0,66 \pm 0,13$ e $0,71 \pm 0,10$, respectivamente. Tais resultados superaram o modelo

não calibrado (DNN-Default) em sensibilidade, refletindo a efetividade do ajuste de limiar frente às alternativas de superamostragem testadas.

5.4 MODELO DE CAMADA 2

Na próxima etapa, desenvolvemos modelos para segunda camada utilizando as predições do modelo DNN-task2task como descritores biológicos na predição de toxicidade de DEs *in vivo* tanto para fêmeas quanto machos. Os classificadores selecionados para os modelos de classificação foram *k*NN e RF. Para a validação do método, utilizamos a estratégia de LOO-CV uma vez que os conjuntos de dados obtidos eram pequenos.

Para geração dos modelos de toxicidade masculina, foram coletados ensaios *in vivo* de *Hershberger* ao qual 220 compostos com atividades sobre a alteração do peso de roedores reportadas foram reportados. Desses 220, 101 compostos foram separados para classificar a atividade de agonista e 119 foram utilizados para classificação de atividade antagonista dos RA. Já para toxicidade feminina, coletamos um conjunto de dados com 109 compostos com atividade reportada para alterações no tamanho do peso uterino de roedores através do ensaio uterotrófico.

A Tabela 7 mostra os principais resultados obtidos para os modelos de predição das AOs relacionadas aos DEs *in vivo*. Na Tabela 8, foi gerado os modelos de RF para os conjuntos de dados *in vivo* como baseline utilizando a divisão randômica para separar os conjuntos em dados de treinamento, teste e validação na proporção 8:1:1, respectivamente. Os resultados apresentaram-se favoráveis para o conjunto de dados feminino, no entanto houve um sobreajuste quando analisamos o conjunto de dados masculino androgênico e antiandrogênico.

Diante desses resultados, conclui-se que os modelos de multitarefa apresentaram melhor performance para potencial desregulação endócrina em machos e fêmeas. ACC e o G-Mean apresentados pela Tabela 7 elucidaram que os modelos agonistas para DEs masculinos foram melhores do que os antagonistas, contudo apresentaram baixa taxa de recall. Quando se analisa os modelos femininos treinados com os descritores biológicos, embora a ACC tenha diminuído em comparação aos modelos masculinos, os resultados de recall foram > 0,70.

Concluimos que o modelo foi melhor para identificar desreguladores sexuais femininos.

Nossos resultados mostram que, utilizando as predições geradas na camada 1, para gerar modelos para predição de toxicidade *in vivo* foram superiores comparadas a geração dos modelos *in vivo* sem o uso de descritores biológicos como mostrado nas Tabelas 7 e 8. Atualmente, observou-se um aumento nas pesquisas de identificação de DEs através de métodos computacionais envolvendo a abordagem de duas camadas. No estudo de Mukherjee, Su e Rajan (2021) foram desenvolvidos modelos de QSAR para identificar domínios (*motifs*) de potenciais DEs tal qual classificar toxicidade ou não dos compostos. Utilizando conjunto de dados da CERAPP, ToxCast e Tox21, os autores treinaram diferentes modelos da Tox21 e literatura e obtiveram resultados promissores com precisão $\geq 0,88$; recall $\geq 0,89$; F1-score $\geq 0,90$; e ACC $\geq 0,90$ (MUKHERJEE; SU; RAJAN, 2021).

Tabela 7: Performance estatística dos modelos de camada 2 *in vivo* divididos através do método *Leave-One-Out Cross Validation*.

Modelo	ACC	Recall	SP	F1	ROC-AUC	G-Mean
<i>kNN</i> -Agonista (Macho)	0,90	0,57	0,95	0,61	0,76	0,73
<i>kNN</i> -Antagonista (Macho)	0,65	0,17	0,91	0,17	0,54	0,39
<i>RF</i> -Agonista (Macho)	0,88	0,28	0,97	0,40	0,63	0,52
<i>RF</i> -Antagonista (Macho)	0,63	0,19	0,87	0,27	0,53	0,40
<i>kNN</i> (Fêmea)	0,75	0,77	0,73	0,77	0,75	0,75
<i>RF</i> (Fêmea)	0,74	0,75	0,73	0,76	0,74	0,74

Outro estudo conduzido por Tan *et al.* (2022) utilizou uma abordagem similar de duas camadas, no entanto gerou modelos de árvore de decisão, RF, SVM, naives Bayes e *kNN* para construir modelos de QSAR na camada um e na camada dois utilizou os resultados da predição dos modelos consenso na camada um para treinar o modelo naive Bayes tanto para atividade DE masculina quanto feminina. As performances dos modelos androgênicos (agonista e antagonista) e estrogênicos

possuíram resultados similares, ao qual equivaleram a ACC = 1; F1 = 1; ACC balanceada = 1 (TAN et al., 2022).

Um projeto de estudo de modelagem em larga escala chamado CERAPP (*Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project*) foi desenvolvido para avaliar milhares de substâncias químicas quanto à atividade relacionada ao RE. O projeto combinou múltiplos modelos desenvolvidos para prever a atividade do RE em um conjunto comum de 32.464 estruturas químicas, sendo 40 deles categóricos e 8 dos modelos contínuos. Os dados do ToxCast disponibilizaram 1.677 moléculas para o conjunto de treinamento, enquanto os dados de várias fontes foram para testar o modelo. Os compostos foram divididos em três classes (a) ligantes; (b) agonistas; e (c) antagonistas). Para os modelos categórico de consenso, o modelo do ToxCast apresentou desempenho de bACC (0,95), SE (0,93) e SP (0,97), já nos dados disponibilizados pela literatura os resultados foram menores com o desempenho de BA (0,61), SP (0,91) e SE (0,30). O CERAPP não utilizou diretamente dados de bioensaios *in vivo*, como os uterotróficos. O projeto se concentrou principalmente em dados *in vitro* de HTS provenientes de programas como o ToxCast e Tox21 para construir seus modelos (MANSOURI et al., 2016).

Tabela 8: Performance estatística dos conjuntos testes *in vivo* para o potencial tóxico feminino e masculino divididos de forma randômica.

Conjunto de Dados	ACC	Recall	SP	F1	MCC	G-Mean
Agonista – Macho	0,90	0,00	1,00	0,85	0,00	0,00
Antagonista – Macho	0,50	0,00	1,00	0,33	0,00	0,00
Fêmea	0,55	0,43	0,75	0,55	0,18	0,57

Outro projeto que seguiu os passos do CERAPP foi o CoMPARA (*Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity*), no entanto, direcionado ao receptor de andrógeno. A primeira fase do desenvolvimento dos modelos de RA foi baseada no uso de 11 ensaios do ToxCast™ e Tox21, cobrindo diferentes tipos de atividade do receptor de andrógeno. Esses ensaios foram usados para gerar um modelo matemático que forneceu uma pontuação AUC (Área Sob a Curva) para prever a atividade agonista e antagonista dos compostos. Os modelos preditivos baseados em kNN para prever a atividade do RA nos dados do CoMPARA apresentaram bons

resultados em termos de desempenho. Para a modalidade de binding, a SE foi de 0,92, a SP de 0,96 e a bACC de 0,94. No modelo de agonista, a SE foi de 0,92, com SP de 1,00 e BA de 0,96. Já para antagonista, a SP foi de 0,91, a SP de 0,97 e a bACC de 0,94, evidenciando modelos robustos e equilibrados em termos de previsão para os três tipos de atividade (MANSOURI et al., 2020).

Os modelos de predição com base em AOP podem fornecer informações toxicológicas mais mecanicistas para os compostos químicos testados. Nossos modelos prevendo atividades MIEs em receptores de estrogênio e androgênio, seus respectivos KEs foram gerados independentemente para os modelos de camada 1. Após isso, nosso modelo DNN-task2task foi utilizado para gerar descritores biológicos para extrapolar a predição no ensaio de *Hershberger* e uterotrófico. Os resultados evidenciaram uma maior extrapolação na predição para identificar se compostos causam alteração do peso uterino.

Os modelos de aprendizado de máquina foram avaliados quanto à sua capacidade de prever a atividade *in vivo* de compostos nos ensaios de *Hershberger* (machos) e uterotrófico (fêmeas). A Tabela 7 ACC dos modelos variou de 63% a 90%, com melhores desempenhos observados para os modelos de agonistas em machos e a classificação geral para fêmeas. No entanto, ao analisar métricas mais informativas, como Recall, SP e F1-score, observa-se que os modelos apresentam dificuldades específicas na classificação de antagonistas. Para os ensaios de *Hershberger*, os modelos apresentaram melhor desempenho na predição de compostos agonistas em relação aos antagonistas. O kNN obteve uma ACC de 90%, mas com um recall de apenas 57% e um F1-score de 0,61, sugerindo que o modelo tem uma tendência a classificar compostos como inativos, mesmo quando ativos, o que é evidenciado pela alta especificidade (95%). Por outro lado, a predição de antagonistas foi mais desafiadora, com ambos os modelos apresentando baixos valores de recall (kNN = 17%, RF = 19%), o que indica uma subestimação desses compostos ativos. Esse resultado é preocupante do ponto de vista regulatório, pois pode resultar em falsos negativos, deixando escapar compostos que poderiam modular negativamente a sinalização da AO androgênica.

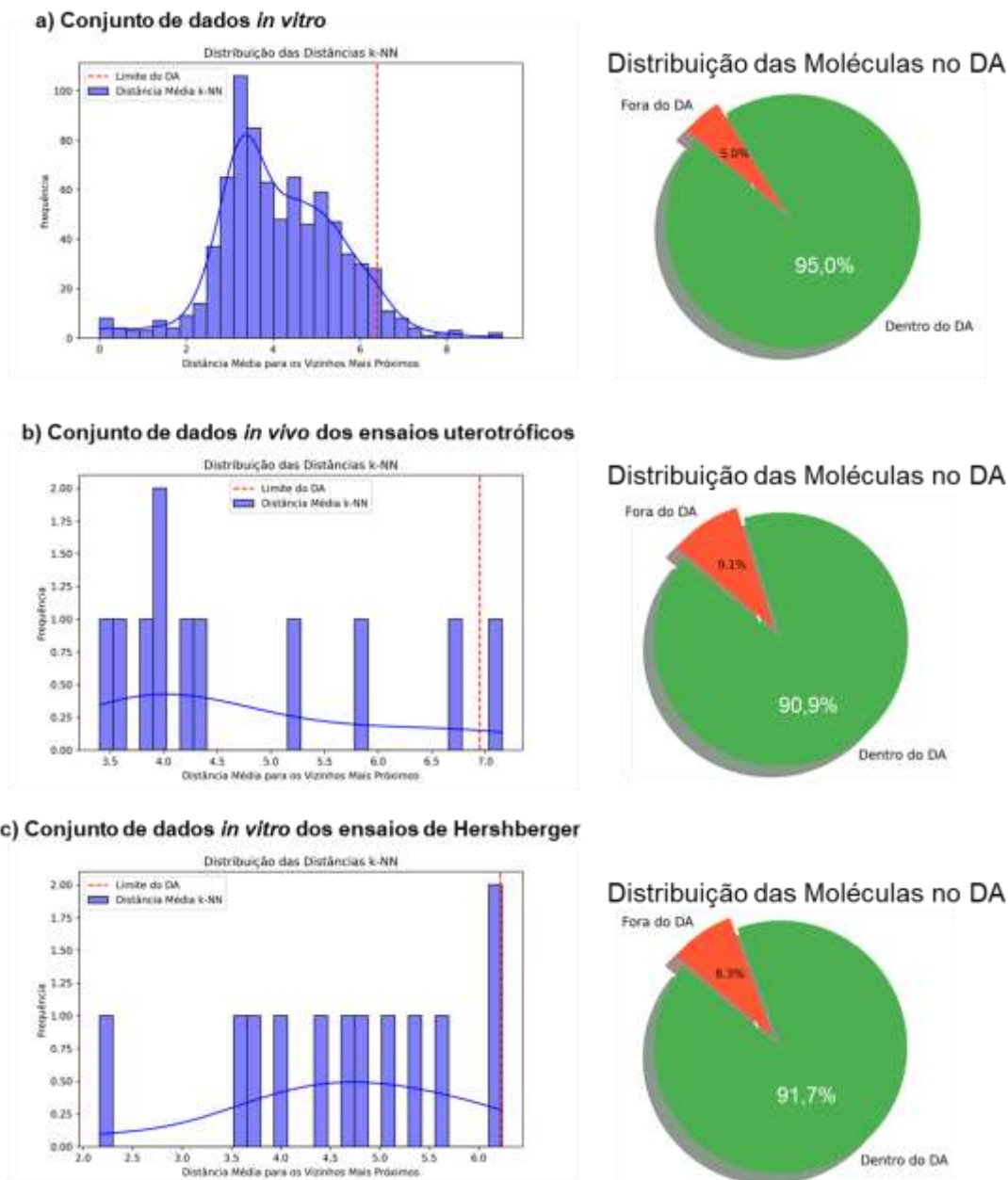
No caso do ensaio uterotrófico, tanto o kNN quanto o RF apresentaram desempenho mais equilibrado, com exatidão de 75% e 74%, respectivamente, e valores de recall próximos de 77%. Esses resultados indicam que os modelos são mais capazes de identificar corretamente os compostos ativos nesse ensaio, o que é relevante, dado que o ensaio uterotrófico é amplamente utilizado na avaliação de desregulação endócrina mediada pelo RE. A métrica G-Mean, que equilibra a sensibilidade e especificidade, também foi consistente para esses modelos, reforçando a confiabilidade da classificação.

O desempenho inferior dos modelos para antagonistas nos ensaios de *Hershberger* pode estar relacionado à baixa representação desses compostos no conjunto de dados, um problema comum em estudos de toxicologia computacional. No geral, os resultados indicam que, embora os modelos apresentem bom desempenho na predição de compostos agonistas e na avaliação de atividade uterotrófica, ajustes são necessários para melhorar a detecção de antagonistas androgênicos, um aspecto crítico para uma avaliação toxicológica mais confiável.

A principal contribuição do trabalho foi a aplicação de modelos de deep learning calibrados para aprimorar a identificação de compostos DEs, extrapolando predições *in vitro* para toxicidade *in vivo* com base em AOPs. Além disso, foi proposta uma abordagem computacional que pode ser aplicada para melhorar a identificação de padrões mecanísticos de toxicidade. No entanto, os resultados ressaltam a necessidade de continuar desenvolvendo e aprimorando técnicas de ML para melhor capturar a complexidade dos dados toxicológicos e aumentar a robustez preditiva, principalmente em cenários onde há uma discrepância maior entre as classes ou quando os dados são escassos, como nos casos dos ensaios masculinos. Infere-se que a combinação de metodologias de calibragem com o uso de modelos avançados, como o DNN-task2task, foi essencial para a melhoria do desempenho preditivo observado. Contudo, novos estudos são necessários para explorar outras abordagens e técnicas de pré-processamento que possam equilibrar o desempenho entre os modelos femininos e masculinos, promovendo uma predição ainda mais precisa e generalizável para DEs.

5.5 DOMÍNIO DE APLICABILIDADE

Figura 22: Avaliação do domínio de aplicabilidade dos conjuntos de dados: **(a)** *in vitro* relacionado aos receptores de androgênio e estrogênio; **(b)** *in vivo* dos ensaios uterotróficos; e **(c)** *in vivo* referente aos bioensaios de *Hershberger*.



Na Figura 22 apresenta histogramas com a distribuição das distâncias euclidianas médias das moléculas do conjunto teste em relação aos seus k vizinhos mais próximos dos seus respectivos conjuntos de treinamento. No histograma cada ponto no eixo X representa a média das distâncias euclidianas entre uma molécula do conjunto de teste e seus 5 vizinhos mais próximos no conjunto de treinamento, enquanto no eixo Y representa a quantidade de moléculas do conjunto de teste que

possuem determinada distância média. Ao lado gráficos de setores representando a porcentagem de moléculas dentro e fora do DA.

O DA estima a incerteza na predição de um composto do conjunto teste com base na sua similaridade aos compostos do conjunto de treinamento, podendo ser determinada de diversas formas e determinada a partir dos descritores do modelo (ANTANASIJEVIĆ et al., 2017; ROY; KAR; AMBURE, 2015). A Figura 22a representa o conjunto de dados *in vitro* utilizados para treinar a camada 1 do modelo, composto por dados do ToxCast e Tox21. A análise do domínio de aplicabilidade (DA) revelou que 95% das moléculas estavam dentro do DA, enquanto 5,03% ficaram fora. Na Figura 22b, que ilustra o conjunto de dados *in vivo* dos ensaios uterotróficos, 90,91% das moléculas permaneceram dentro do DA, e 9,09% foram classificadas como fora. Já na Figura 22c, que representa os ensaios de *Hershberger*, 91,67% das moléculas estavam dentro do DA, enquanto 8,33% ficaram fora.

Os resultados destacam que a grande maioria das moléculas está dentro do DA, o que confere alta confiabilidade às predições. Entretanto, as moléculas fora do DA não devem ser desconsideradas, pois podem representar compostos com perfis químicos distintos, ampliando a diversidade do espaço químico explorado. No entanto, se uma molécula estiver fora do DA, necessariamente não significa erro na previsão pelo modelo, mas informa um alto nível de possível incerteza (GUPTA; ADAMS; BERRY, 2016).

5.6 INTERPRETAÇÃO MECANÍSTICA

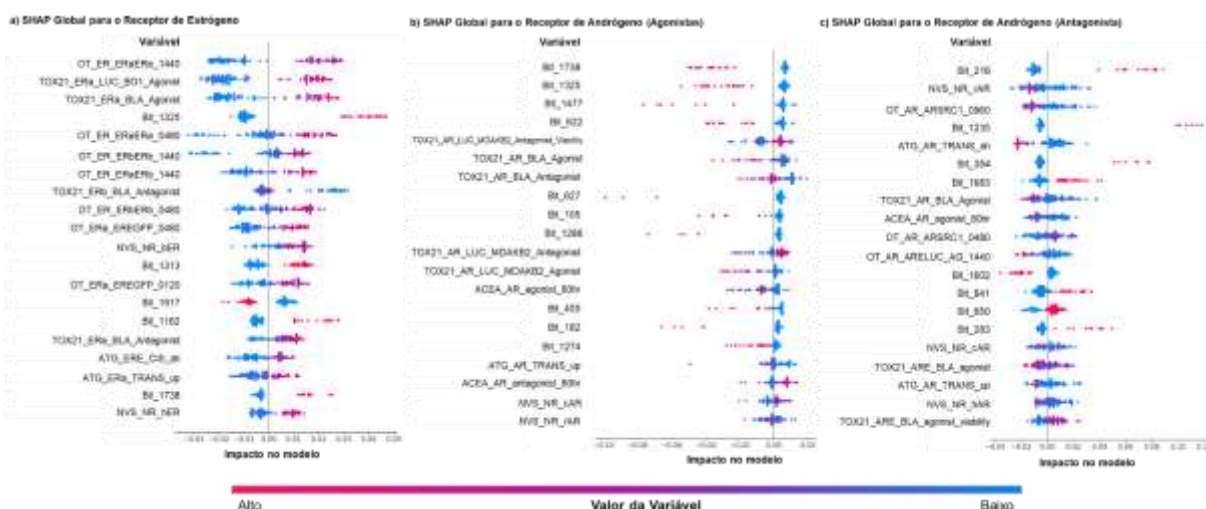
Um dos principais desafios da abordagem QSAR é a dificuldade em interpretar e justificar as previsões do modelo. Além disso, na química medicinal, a transparência dos modelos é essencial em contextos nos quais tempo e custo são fatores críticos. Nesse sentido, os valores SHAP derivados dos modelos preditivos de atividade no RE e no RA (agonismo e antagonismo) fornecem explicações concisas e informativas sobre o comportamento dos DEs (Figura 23 e 24). Os valores SHAP atribuem uma pontuação de contribuição para cada variável, refletindo sua influência na previsão do modelo. No caso dos descritores moleculares ECFP4, cada fragmento químico (ou bit do descritor) recebe um valor SHAP, indicando o impacto relativo na atividade do

composto nos respectivos receptores. No gráfico beeswarm (Figura 23), cada ponto representa um composto da base de dados, e as variáveis estão organizadas no eixo Y em ordem decrescente de importância para a atividade predita no RE (Figura 23a) e nos modelos de agonismo e antagonismo do receptor de andrógeno (Figuras 23b e 23c). O eixo “x” indica a magnitude e direção do impacto de cada variável na predição: quanto maior o SHAP value, maior a probabilidade de o composto ser ativo no respectivo modelo.

A coloração dos pontos representa os valores originais das variáveis:

- Azul: valores baixos da variável (exemplo: baixa resposta em um ensaio ou ausência de um fragmento molecular).
- Magenta/Rosa: valores altos da variável (exemplo: alta resposta em um ensaio ou presença de um fragmento molecular).

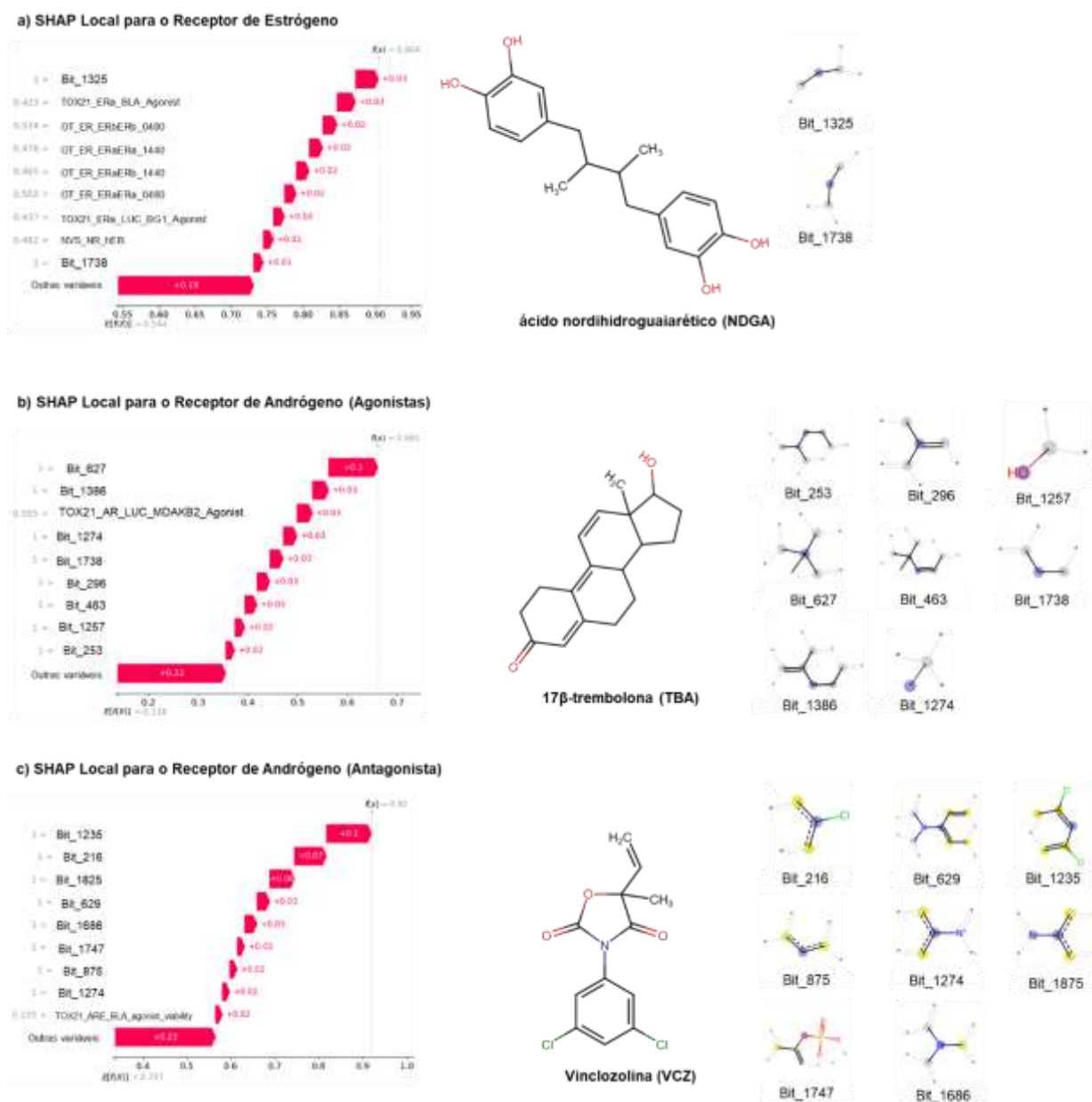
Figura 23: Gráfico de beeswarm do SHAP global para avaliar a influência das variáveis nos modelos de **(a)** receptor de estrógeno; **(b)** agonista de receptor de andrógeno; e **(c)** antagonista de receptor de andrógeno.



Na Figura 23a, observa-se que as variáveis mais influentes na predição da atividade no RE estão predominantemente relacionadas aos ensaios biológicos da camada 1, exercendo um impacto maior que os fragmentos moleculares. Por outro lado, nas Figuras 23b e 23c, a influência dos fragmentos moleculares (bits do ECFP4) se sobressai em relação aos ensaios *in vitro*, sugerindo que a estrutura química dos

compostos desempenha um papel mais determinante na predição de agonismo e antagonismo no receptor de andrógeno.

Figura 24: SHAP local e fragmentos moleculares (bits) para moléculas específicas relacionadas ao (a) receptor de estrógeno; (b) agonista de receptor de andrógeno; e (c) antagonista de receptor de andrógeno.



Ao relacionar esses resultados com os modelos de Random Forest, percebe-se que os padrões associados aos ensaios biológicos femininos foram melhor capturados e aprendidos pelo modelo em comparação com aqueles referentes ao receptor de andrógeno. Esse achado pode indicar uma maior robustez do modelo para

predições de atividade no RE, possivelmente devido à qualidade dos dados ou à natureza das interações químico-biológicas envolvidas.

Para aprofundar a interpretação das predições do modelo, foi realizada uma análise local (Figura 24) utilizando o SHAP para compostos específicos: ácido nordihidroguaiarético (Figura 24a), 17 β -trembolona (Figura 24b) e Vinclozolina (Figura 24c), respectivamente esses compostos apresentam atividades para o RE, estímulo do RA e antagonista do RA. Nos gráficos, as linhas de base ($E[f(x)]=0,54$ para o NDGA; $E[f(x)]=0,13$ para o TBA; e $E[f(x)]=0,33$ para VCZ) representam as médias das previsões do modelo, ou seja, a probabilidade média de um composto possuir atividade para seus respectivos receptores antes da consideração de suas características individuais. No entanto, para essas moléculas em específico, a predição final dos modelos ($f(x)$) foram respectivamente 0,90; 0,66; e 0,92 indicando uma probabilidade significativamente maior de atividade. Esse aumento na predição pode ser explicado pelas contribuições individuais das variáveis.

Na Figura 24a elucida os bits 1325 e 1738 com cadeias alifáticas que conferem grupos espaçadores ao NDGA. O ácido nordihidroguaiarético (NDGA) é um polifenol derivado da lignina, caracterizado por possuir duas unidades de guaiacol ligadas por uma ponte de butano, com quatro grupos hidroxila distribuídos nos dois anéis aromáticos. A distância entre as hidroxilas é semelhante ao de outros derivados esteroides, como o para o reconhecimento pelo biorreceptor, apresentando uma distância superior à 10 Å (DUAX et al., 1984). Além dos fragmentos moleculares, os ensaios *in vitro* também exerceram influência na predição. Dois ensaios do ToxCast apresentaram valores intermediários de resposta (0.423 e 0.534), contribuindo para a predição final do modelo. O impacto desses ensaios pode estar relacionado à ativação de vias biológicas associadas ao RE, sugerindo que o modelo aprendeu padrões relevantes entre os resultados experimentais e a atividade molecular.

A 17 β -trembolona é um agonista com afinidade elevada pelos RAs em vertebrados muito utilizado como um esteroide anabólico para melhorar a conversão alimentar e aumentar a massa muscular no gado. Sua exposição no ambiente se dá através do escoamento de resíduos (urina e fezes) de gado dosado com acetato de trembolona, o que leva a sua contaminação em águas superficiais associadas a

confinamentos de animais (KOLODZIEJ et al., 2013; JONES et al., 2014; ANKLEY et al., 2018). Os fragmentos moleculares (bits) ilustrados na Figura 2B mostraram-se presentes para contribuição da atividade da TBA, além disso o ensaio *in vitro* TOX21_AR_LUC_MDKB2_Agonist mostrou valor potencial de 0.55 (55%) na para contribuição positiva na atividade do modelo. Tendo em vista que esse ensaio é relacionado à ativação dos receptores de andrógeno em diferentes sistemas celulares, sugere-se que aprendeu padrões relevantes químicos na camada 1 que pudesse contribuir para atividade da TBA. Já o fungicida vinclozolina (VCZ) é utilizado no controle de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Monilinia* spp. de algumas frutas. Seu contato com animais, como camundongos, foi relacionado à retenção de mamilos, granulomas epididimais e glândulas acessórias sexuais pequenas ou ausentes. Os bits 216 e 1235 na Figura 24c evidenciam cloros ligados a um anel de benzeno contribuem para a atividade antagonista do RA, isso condiz com os achados das relações entre estrutura e atividade do 5,6-dicloro-benzimidazol e seus derivados, onde a presença dos dois cloros ligados ao benzeno mostraram uma redução no peso da próstata de camundongos em 77% comparado com estruturas similares de 2,5-benzimidazol substituídos por flúor e cloro (redução em 57%), cloro e trifluorometil (42%) e por ciano e trifluorometil (63%) (NG et al., 2007).

A análise mecanística realizada com SHAP revelou que os padrões estruturais e os ensaios *in vitro* influenciam diretamente a atividade dos compostos nos receptores hormonais. O NDGA apresentou fragmentos estruturais com espaçamento semelhante ao estradiol, favorecendo sua interação com o RE, enquanto a TBA demonstrou forte contribuição de um ensaio associado à ativação de RAs. Já a VCZ destacou-se por grupos funcionais responsáveis por seu efeito antiandrogênico, reforçando a correlação entre estrutura química e atividade biológica prevista pelo modelo.

Este estudo representa um avanço significativo na predição computacional de compostos DEs, ao integrar redes neurais profundas com calibração refinada para extrapolação de dados *in vitro* para toxicidade *in vivo*. A utilização de AOPs fortaleceu a base mecanicista das predições, tornando os modelos mais robustos e aplicáveis à triagem toxicológica. Os resultados demonstraram que a calibração do limiar elevou substancialmente o desempenho preditivo, especialmente na identificação de compostos verdadeiramente tóxicos, superando desafios inerentes à toxicologia computacional. Além disso, a aplicação de técnicas avançadas, como superamostragem e ajuste da calibração do limiar, evidenciou o potencial de otimização para minimizar vieses e aprimorar a sensibilidade dos modelos.

Apesar das conquistas, desafios persistem, como a melhoria da predição de antagonistas androgênicos e o equilíbrio entre modelos para toxicidade em machos e fêmeas. No entanto, a incorporação futura de redes neurais de grafos e a interpretação via SHAPley Value prometem aumentar a exatidão e a transparência das predições. A disponibilização dos modelos via GitHub marca um passo decisivo para a acessibilidade e aplicabilidade dessas ferramentas, contribuindo para a modernização da toxicologia computacional e a redução da dependência de testes *in vivo*. Assim, este trabalho não apenas avança o estado da arte na predição de DEs, mas também fortalece a transição para uma toxicologia mais ética, eficiente e baseada em evidências.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, Timothy E. H.; GOODMAN, Jonathan M.; GUTSELL, Steve; RUSSELL, Paul J. A History of the Molecular Initiating Event. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 2060–2070, 2016. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00341.

ALLENSPACH, Stephan; HISS, Jan A.; SCHNEIDER, Gisbert. Neural multi-task learning in drug design. **Nature Machine Intelligence**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 124–137, 2024. DOI: 10.1038/s42256-023-00785-4.

ALVES, Vinicius M.; MURATOV, Eugene N.; ZAKHAROV, Alexey; MURATOV, Nail N.; ANDRADE, Carolina H.; TROPSHA, Alexander. Chemical toxicity prediction for major classes of industrial chemicals: Is it possible to develop universal models covering cosmetics, drugs, and pesticides? **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 112, p. 526–534, 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2017.04.008.

ANKLEY, Gerald T.; COADY, Katherine K.; GROSS, Melanie; HOLBECH, Henrik; LEVINE, Steven L.; MAACK, Gerd; WILLIAMS, Mike. A critical review of the environmental occurrence and potential effects in aquatic vertebrates of the potent androgen receptor agonist 17 β -trenbolone. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 2064–2078, 2018. DOI: 10.1002/etc.4163.

ANTANASIJEVIĆ, Davor; ANTANASIJEVIĆ, Jelena; TRIŠOVIĆ, Nemanja; UŠĆUMLIĆ, Gordana; POCAJT, Viktor. From Classification to Regression Multitasking QSAR Modeling Using a Novel Modular Neural Network: Simultaneous Prediction of Anticonvulsant Activity and Neurotoxicity of Succinimides. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 4476–4484, 2017. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00582.

BAKER, V. A. Endocrine disruptors — testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 413–419, 2001. DOI: 10.1016/S0887-2333(01)00045-5.

BALAGUER, Patrick; DELFOSSE, Vanessa; GRIMALDI, Marina; BOURGUET, William. Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. **Comptes Rendus. Biologies**, [S. l.], v. 340, n. 9–10, p. 414–420, 2017. DOI: 10.1016/j.crv.2017.08.002.

BALI, Donjeta; SCALTRITO, Francesca; GRIMALDI, Maria Teresa; GIARDINO, Ida; PETTOELLO-MANTOVANI, Massimo; PASTORE, Maria. The impact of the endocrine disruptors on child health. **Global Pediatrics**, [S. l.], v. 5, p. 100069, 2023. DOI: 10.1016/j.gped.2023.100069.

BASTIKAR, Virupaksha; BASTIKAR, Alpana; GUPTA, Pramodkumar. Quantitative structure–activity relationship-based computational approaches. **Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection**, [S. l.], p. 191–205, 2022. DOI: 10.1016/B978-0-323-91172-6.00001-7.

BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 39, n. 15, p. 2887–2893, 1996. DOI: 10.1021/jm9602928.

BEYER, Angelika; BIZIUK, Marek. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 201, p. 137–158, 2009. DOI: 10.1007/978-1-4419-0032-6_5.

BJÖRNSTRÖM, Linda; SJÖBERG, Maria. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005. DOI: 10.1210/me.2004-0486.

BROWNE, P.; KLEINSTREUER, N. C.; CEGER, P.; DEISENROTH, C.; BAKER, N.; MARKEY, K.; THOMAS, R. S.; JUDSON, R. J.; CASEY, W. Development of a curated Hershberger database. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, [S. l.], v. 81, p. 259–271, 2018. DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.08.016.

BROWNE, Patience; JUDSON, Richard S.; CASEY, Warren M.; KLEINSTREUER, Nicole C.; THOMAS, Russell S. Screening Chemicals for Estrogen Receptor Bioactivity Using a Computational Model. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 49, n. 14, p. 8804–8814, 2015. DOI: 10.1021/acs.est.5b02641.

BROWNE, Patience; NOYES, Pamela D.; CASEY, Warren M.; DIX, David J. Application of Adverse Outcome Pathways to U.S. EPA's Endocrine Disruptor Screening Program. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 125, n. 9, p. 096001, 2017. DOI: 10.1289/EHP1304.

CARRACEDO-REBOREDO, Paula; LIÑARES-BLANCO, Jose; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, Nereida; CEDRÓN, Francisco; NOVOA, Francisco J.; CARBALLAL, Adrian; MAOJO, Victor; PAZOS, Alejandro; FERNANDEZ-LOZANO, Carlos. A review on machine learning approaches and trends in drug discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 19, p. 4538–4558, 2021. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.08.011.

CARUANA, Rich. Multitask Learning. *Em*: THRUN, Sebastian; PRATT, Lorien (org.). **Learning to Learn**. Boston, MA: Springer US, 1998. p. 95–133. DOI: 10.1007/978-1-4615-5529-2_5. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5529-2_5. Acesso em: 26 jul. 2024.

CAVASOTTO, Claudio N.; SCARDINO, Valeria. Machine Learning Toxicity Prediction: Latest Advances by Toxicity End Point. **ACS Omega**, [S. l.], v. 7, n. 51, p. 47536–47546, 2022. DOI: 10.1021/acsomega.2c05693.

CHAMBLISS, Ken L.; SHAUL, Philip W. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. **Steroids**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 413–419, 2002. DOI: 10.1016/s0039-128x(01)00177-5.

CHAPON, Valentin; BRIGNON, Jean-Marc; GASPERI, Johnny. Non-persistent chemicals in polymer and non-polymer products can cause persistent environmental contamination: evidence with DEHP in Europe. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 30, n. 15, p. 44952–44962, 2023. DOI: 10.1007/s11356-023-25405-x.

CHAUHAN, Vinita et al. Bringing together scientific disciplines for collaborative undertakings: a vision for advancing the adverse outcome pathway framework. **International Journal of Radiation Biology**, [S. l.], v. 97, n. 4, p. 431–441, 2021. DOI: 10.1080/09553002.2021.1884314.

CHIU, Yu-Wen; TUNG, Chun-Wei; WANG, Chia-Chi. Multitask learning for predicting pulmonary absorption of chemicals. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 185, p. 114453, 2024. DOI: 10.1016/j.fct.2024.114453.

CHOUDHARY, Kamal et al. Recent advances and applications of deep learning methods in materials science. **npj Computational Materials**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–26, 2022. DOI: 10.1038/s41524-022-00734-6.

CIALLELLA, Heather L.; RUSSO, Daniel P.; ALEKSUNES, Lauren M.; GRIMM, Fabian A.; ZHU, Hao. Revealing Adverse Outcome Pathways from Public High-Throughput Screening Data to Evaluate New Toxicants by a Knowledge-Based Deep Neural Network Approach. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 55, n. 15, p. 10875–10887, 2021. DOI: 10.1021/acs.est.1c02656.

CIALLELLA, Heather L.; ZHU, Hao. Advancing Computational Toxicology in the Big Data Era by Artificial Intelligence: Data-Driven and Mechanism-Driven Modeling for Chemical Toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 536–547, 2019. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.8b00393.

CLODE, S. A. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 35–43, 2006. DOI: 10.1016/j.beem.2005.09.011.

CONOLLY, Rory B.; ANKLEY, Gerald T.; CHENG, WanYun; MAYO, Michael L.; MILLER, David H.; PERKINS, Edward J.; VILLENEUVE, Daniel L.; WATANABE, Karen H. Quantitative Adverse Outcome Pathways and Their Application to Predictive Toxicology. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 51, n. 8, p. 4661–4672, 2017. DOI: 10.1021/acs.est.6b06230.

COUSINS, Ian T.; DEWITT, Jamie C.; GLÜGE, Juliane; GOLDENMAN, Gretta; HERZKE, Dorte; LOHMANN, Rainer; NG, Carla A.; SCHERINGER, Martin; WANG, Zhanyun. The High Persistence of PFAS is Sufficient for their Management as a Chemical Class. **Environmental science. Processes & impacts**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 2307–2312, 2020. DOI: 10.1039/d0em00355g.

DAVEY, Rachel A.; GROSSMANN, Mathis. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **The Clinical Biochemist Reviews**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 3–15, 2016.

DEY, Sukhendu; BALLAV, Puspita; SAMANTA, Palas; MANDAL, Arghya; PATRA, Atanu; DAS, Subhas; MONDAL, Arnab Kumar; GHOSH, Apurba Ratan. Time-Dependent Naphthalene Toxicity in *Anabas testudineus* (Bloch): A Multiple Endpoint Biomarker Approach. **ACS Omega**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 317–326, 2021. DOI: 10.1021/acsomega.0c04603.

DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia; BOURGUIGNON, Jean-Pierre; GIUDICE, Linda C.; HAUSER, Russ; PRINS, Gail S.; SOTO, Ana M.; ZOELLER, R. Thomas; GORE, Andrea C. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009. DOI: 10.1210/er.2009-0002.

DIX, David J.; HOUCK, Keith A.; MARTIN, Matthew T.; RICHARD, Ann M.; SETZER, R. Woodrow; KAVLOCK, Robert J. The ToxCast Program for Prioritizing Toxicity Testing of Environmental Chemicals. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 5–12, 2007. DOI: 10.1093/toxsci/kfl103.

DORFMAN, RALPH I.; DORFMAN, ADELIN S. ESTROGEN ASSAYS USING THE RAT UTERUS1. **Endocrinology**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 65–69, 1954. DOI: 10.1210/endo-55-1-65.

DRUCKER, Harris; BURGESS, Christopher J. C.; KAUFMAN, Linda; SMOLA, Alex; VAPNIK, Vladimir. Support Vector Regression Machines. *Em: ADVANCES IN NEURAL INFORMATION PROCESSING SYSTEMS 1996*, **Anais [...]**. : MIT Press, 1996. Disponível em: <https://proceedings.neurips.cc/paper/1996/hash/d38901788c533e8286cb6400b40b386d-Abstract.html>. Acesso em: 12 ago. 2024.

DUAX, W. L.; SWENSON, D. C.; STRONG, P. D.; KORACH, K. S.; MCLACHLAN, J.; METZLER, M. Molecular structures of metabolites and analogues of diethylstilbestrol and their relationship to receptor binding and biological activity. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 520–525, 1984.

DUTTA, Sulagna; SENGUPTA, Pallav; BAGCHI, Sovan; CHHIKARA, Bhupender S.; PAVLÍK, Aleš; SLÁMA, Petr; ROYCHOUDHURY, Shubhadeep. Reproductive toxicity of combined effects of endocrine disruptors on human reproduction. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 11, p. 1162015, 2023. DOI: 10.3389/fcell.2023.1162015.

EBSA, Girma; GIZAW, Birhanu; ADMASSIE, Mesele; DEGU, Tizazu; ALEMU, Tesfaye. The role and mechanisms of microbes in dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its residues bioremediation. **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 42, p. e00835, 2024. DOI: 10.1016/j.btre.2024.e00835.

EDER, I. E.; CULIG, Z.; PUTZ, T.; NESSLER-MENARDI, C.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H. Molecular biology of the androgen receptor: from molecular understanding to the clinic. **European Urology**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 241–251, 2001. DOI: 10.1159/000049782.

EGALINI, Filippo; MARINELLI, Lorenzo; ROSSI, Mattia; MOTTA, Giovanna; PRENCIPE, Nunzia; ROSSETTO GIACCHERINO, Ruth; PAGANO, Loredana; GROTTOLI, Silvia; GIORDANO, Roberta. Endocrine disrupting chemicals: effects on pituitary, thyroid and adrenal glands. **Endocrine**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 395–405, 2022. DOI: 10.1007/s12020-022-03076-x.

ERCAN, Oya; TARCIN, Gurkan. Overview on Endocrine disruptors in food and their effects on infant's health. **Global Pediatrics**, [S. l.], v. 2, p. 100019, 2022. DOI: 10.1016/j.gped.2022.100019.

FERREIRA, Elizabeth Igne; BARREIRO, Eliezer Jesus; GIAROLLA, Jeanine; PARISE FILHO, Roberto. Fundamentos de química farmacêutica medicinal. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/003101808>. Acesso em: 11 ago. 2024.

FOURCHES, Denis; MURATOV, Eugene; TROPSHA, Alexander. Trust, but Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 56, n. 7, p. 1243–1252, 2016. DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00129.

FOUYET, Sophie; FERGER, Marie-Caroline; LEPROUX, Pascale; RAT, Patrice; DUTOT, Mélody. Advancing Endocrine Disruptors via In Vitro Evaluation: Recognizing the Significance of the Organization for Economic Co-Operation and Development and United States Environmental Protection Agency Guidelines, Embracing New Assessment Methods, and the Urgent Need for a Comprehensive Battery of Tests. **Toxics**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 183, 2024. DOI: 10.3390/toxics12030183.

FUENTES, Nathalie; SILVEYRA, Patricia. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in protein chemistry and structural biology**, [S. l.], v. 116, p. 135–170, 2019. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.

GANESH, Krishna N. et al. Green Chemistry: A Framework for a Sustainable Future. **Organic Process Research & Development**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1455–1459, 2021. DOI: 10.1021/acs.oprd.1c00216.

GHASEMI, Fahimeh; MEHRIDEHNAVI, Alireza; PÉREZ-GARRIDO, Alfonso; PÉREZ-SÁNCHEZ, Horacio. Neural network and deep-learning algorithms used in QSAR studies: merits and drawbacks. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1784–1790, 2018. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.06.016.

GINSBERG, Gary L.; HATTIS, Dale B.; ZOELLER, R. Thomas; RICE, Deborah C. Evaluation of the U.S. EPA/OSWER preliminary remediation goal for perchlorate in groundwater: focus on exposure to nursing infants. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 361–369, 2007. DOI: 10.1289/ehp.9533.

GORE, A. C.; CHAPPELL, V. A.; FENTON, S. E.; FLAWS, J. A.; NADAL, A.; PRINS, G. S.; TOPPARI, J.; ZOELLER, R. T. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 593–602, 2015. DOI: 10.1210/er.2015-1093.

GRAMATICA, Paola. Principles of QSAR models validation: internal and external. **QSAR & Combinatorial Science**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 694–701, 2007. DOI: 10.1002/qsar.200610151.

GRAY, L. Earl et al. Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. **Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 719–750, 1997. DOI: 10.1016/S0890-6238(97)00025-7.

GRINO, PLACIDO B.; GRIFFIN, JAMES E.; WILSON, JEAN D. Testosterone at High Concentrations Interacts with the Human Androgen Receptor Similarly to Dihydrotestosterone*. **Endocrinology**, [S. l.], v. 126, n. 2, p. 1165–1172, 1990. DOI: 10.1210/endo-126-2-1165.

GUARNOTTA, Valentina; AMODEI, Roberta; FRASCA, Francesco; AVERSA, Antonio; GIORDANO, Carla. Impact of Chemical Endocrine Disruptors and Hormone Modulators on the Endocrine System. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 5710, 2022. DOI: 10.3390/ijms23105710.

GUPTA, Jyoti K.; ADAMS, Dave J.; BERRY, Neil G. Will it gel? Successful computational prediction of peptide gelators using physicochemical properties and molecular fingerprints. **Chemical Science**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 4713–4719, 2016. DOI: 10.1039/C6SC00722H.

HALDER, Amit Kumar; MOURA, Ana S.; CORDEIRO, M. Natalia D. S. Predicting the ecotoxicity of endocrine disruptive chemicals: Multitasking in silico approaches towards global models. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 889, p. 164337, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164337.

HANSCH, Corwin; MALONEY, Peyton P.; FUJITA, Toshio; MUIR, Robert M. Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. **Nature**, [S. l.], v. 194, n. 4824, p. 178–180, 1962. DOI: 10.1038/194178b0.

HARDELL, Lennart et al. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 111, n. 7, p. 930–934, 2003.

HARVEY, Philip W. Adrenocortical endocrine disruption. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 155, n. Pt B, p. 199–206, 2016. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.10.009.

HASSAN, Saqib; THACHARODI, Aswin; PRIYA, Anshu; MEENATCHI, R.; HEGDE, Thanushree A.; R, Thangamani; NGUYEN, HT; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Endocrine disruptors: Unravelling the link between chemical exposure and Women's reproductive health. **Environmental Research**, [S. l.], v. 241, p. 117385, 2024. DOI: 10.1016/j.envres.2023.117385.

HE, Haibo; BAI, Yang; GARCIA, Eduardo A.; LI, Shutao. ADASYN: Adaptive synthetic sampling approach for imbalanced learning. *Em: 2008 IEEE INTERNATIONAL JOINT CONFERENCE ON NEURAL NETWORKS (IEEE WORLD CONGRESS ON COMPUTATIONAL INTELLIGENCE) 2008, Anais [...]. Em: 2008 IEEE INTERNATIONAL JOINT CONFERENCE ON NEURAL NETWORKS (IEEE WORLD CONGRESS ON COMPUTATIONAL INTELLIGENCE).* [s.l: s.n.] p. 1322–1328. DOI: 10.1109/IJCNN.2008.4633969. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/4633969>. Acesso em: 22 ago. 2024.

HERSHBERGER, L. G.; SHIPLEY, E. G.; MEYER, R. K. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), [S. l.]**, v. 83, n. 1, p. 175–180, 1953. DOI: 10.3181/00379727-83-20301.

HILLER-STURMHÖFEL, S.; BARTKE, A. The endocrine system: an overview. **Alcohol Health and Research World, [S. l.]**, v. 22, n. 3, p. 153–164, 1998.

HO, V.; PELLAND-ST-PIERRE, L.; GRAVEL, S.; BOUCHARD, M. F.; VERNER, M. A.; LABRÈCHE, F. Endocrine disruptors: Challenges and future directions in epidemiologic research. **Environmental Research, [S. l.]**, v. 204, p. 111969, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111969.

HU, Xin; SAUNDERS, Neil; SAFLEY, Susan; SMITH, Matthew Ryan; LIANG, Yongliang; TRAN, ViLinh; SHARMA, Joe; JONES, Dean P.; WEBER, Collin J. Environmental chemicals and metabolic disruption in primary and secondary human parathyroid tumors. **Surgery, [S. l.]**, v. 169, n. 1, p. 102–108, 2021. DOI: 10.1016/j.surg.2020.06.010.

HU, Yuxuan; REN, Qiuhan; LIU, Xintong; GAO, Liming; XIAO, Lecheng; YU, Wenyong. In Silico Prediction of Human Organ Toxicity via Artificial Intelligence Methods. **Chemical Research in Toxicology, [S. l.]**, v. 36, n. 7, p. 1044–1054, 2023. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.2c00411.

HUANG, Ruili. A Quantitative High-Throughput Screening Data Analysis Pipeline for Activity Profiling. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), [S. l.]**, v. 2474, p. 133–145, 2022. DOI: 10.1007/978-1-0716-2213-1_13.

IDOWU, Ifeoluwa Grace; MEGSON, David; TIKTAK, Guuske; DEREVIANKIN, Mike; SANDAU, Courtney D. Polychlorinated biphenyl (PCB) half-lives in humans: A systematic review. **Chemosphere, [S. l.]**, v. 345, p. 140359, 2023. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.140359.

ISTVAN, M.; RAHBAN, R.; DANANCHE, B.; SENN, A.; STETTLER, E.; MULTIGNER, L.; NEF, S.; GARLANTÉZEC, R. Maternal occupational exposure to endocrine-disrupting chemicals during pregnancy and semen parameters in adulthood: results of a nationwide cross-sectional study among Swiss conscripts. **Human Reproduction (Oxford, England), [S. l.]**, v. 36, n. 7, p. 1948–1958, 2021. DOI: 10.1093/humrep/deab034.

JAACKS, Lindsay M. et al. Metabolite of the pesticide DDT and incident type 2 diabetes in urban India. **Environment International**, [S. l.], v. 133, p. 105089, 2019. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105089.

JEONG, Jaeseong; CHOI, Jinhee. Artificial Intelligence-Based Toxicity Prediction of Environmental Chemicals: Future Directions for Chemical Management Applications. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 56, n. 12, p. 7532–7543, 2022. DOI: 10.1021/acs.est.1c07413.

JIAO, Zeren; HU, Pingfan; XU, Hongfei; WANG, Qingsheng. Machine Learning and Deep Learning in Chemical Health and Safety: A Systematic Review of Techniques and Applications. **ACS Chemical Health & Safety**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 316–334, 2020. DOI: 10.1021/acs.chas.0c00075.

JOHANSSON, Hanna Katarina Lilith; SVINGEN, Terje; FOWLER, Paul A.; VINGGAARD, Anne Marie; BOBERG, Julie. Environmental influences on ovarian dysgenesis - developmental windows sensitive to chemical exposures. **Nature Reviews. Endocrinology**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 400–414, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2017.36.

JONES, Gerrad D.; BENCHETLER, Peter V.; TATE, Kenneth W.; KOLODZIEJ, Edward P. Surface and subsurface attenuation of trenbolone acetate metabolites and manure-derived constituents in irrigation runoff on agro-ecosystems. **Environmental Science: Processes & Impacts**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 2507–2516, 2014. DOI: 10.1039/C4EM00385C.

JUDSON, Richard; HOUCK, Keith; FRIEDMAN, Katie Paul; BROWN, Jason; BROWNE, Patience; JOHNSTON, Paul A.; CLOSE, David A.; MANSOURI, Kamel; KLEINSTREUER, Nicole. Selecting a minimal set of androgen receptor assays for screening chemicals. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, [S. l.], v. 117, p. 104764, 2020. DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104764.

JUDSON, Richard S. et al. Integrated Model of Chemical Perturbations of a Biological Pathway Using 18 In Vitro High-Throughput Screening Assays for the Estrogen Receptor. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, [S. l.], v. 148, n. 1, p. 137–154, 2015. DOI: 10.1093/toxsci/kfv168.

KALETA, Michal; OKLESTKOVA, Jana; KLÍČOVÁ, Kateřina; KVASNICA, Miroslav; KONÍČKOVÁ, Dorota; MENŠÍKOVÁ, Kateřina; STRNAD, Miroslav; NOVÁK, Ondřej. Simultaneous Determination of Selected Steroids with Neuroactive Effects in Human Serum by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **ACS Chemical Neuroscience**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 1990–2005, 2024. DOI: 10.1021/acschemneuro.3c00824.

KASONGA, Teddy Kabeya; COETZEE, Martie A. A.; KAMIKA, Ilunga; NGOLE-JEME, Veronica M.; BENTEKE MOMBA, Maggy Ndombo. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 277, p. 111485, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111485.

KLEINSTREUER, Nicole C. et al. Development and Validation of a Computational Model for Androgen Receptor Activity. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 946–964, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00347.

KLEINSTREUER, Nicole C.; CEGER, Patricia C.; ALLEN, David G.; STRICKLAND, Judy; CHANG, Xiaoqing; HAMM, Jonathan T.; CASEY, Warren M. A Curated Database of Rodent Uterotrophic Bioactivity. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 124, n. 5, p. 556–562, 2016. DOI: 10.1289/ehp.1510183.

KNAPEN, Dries et al. Adverse Outcome Pathway Networks I: Development and Applications. **Environmental toxicology and chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1723–1733, 2018. DOI: 10.1002/etc.4125.

KNAPEN, Dries; VERGAUWEN, Lucia; VILLENEUVE, Daniel L.; ANKLEY, Gerald T. The potential of AOP networks for reproductive and developmental toxicity assay development. **Reproductive Toxicology**, 43rd Annual Conference of the European Teratology Society. [S. l.], v. 56, 43rd Annual Conference of the European Teratology Society, p. 52–55, 2015. DOI: 10.1016/j.reprotox.2015.04.003.

KOJIMA, Hiroyuki; KATSURA, Eiji; TAKEUCHI, Shinji; NIYAMA, Kazuhito; KOBAYASHI, Kunihiro. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 112, n. 5, p. 524–531, 2004. DOI: 10.1289/ehp.6649.

KOŁODZIEJ, Edward P.; QU, Shen; FORSGREN, Kristy L.; LONG, Sarah A.; GLOER, James B.; JONES, Gerrad D.; SCHLENK, Daniel; BALTRUSAITIS, Jonas; CWIERTNY, David M. Identification and environmental implications of photo-transformation products of trenbolone acetate metabolites. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 5031–5041, 2013. DOI: 10.1021/es3052069.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 93, n. 12, p. 5925–5930, 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.12.5925.

KUROWSKA, Patrycja; MLYCZYŃSKA, Ewa; DAWID, Monika; RESPEKTA, Natalia; PICH, Karolina; SERRA, Loïse; DUPONT, Joëlle; RAK, Agnieszka. Endocrine disruptor chemicals, adipokines and reproductive functions. **Endocrine**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 205–218, 2022. DOI: 10.1007/s12020-022-03061-4.

LEIST, Marcel et al. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 91, n. 11, p. 3477–3505, 2017. DOI: 10.1007/s00204-017-2045-3.

LI, De-Kun; ZHOU, ZhiJun; MIAO, Maohua; HE, Yonghua; WANG, JinTao; FERBER, Jeannette; HERRINTON, Lisa J.; GAO, ErSheng; YUAN, Wei. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 625–630.e4, 2011. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.026.

LI, Jianmin; ZHAO, Tian; YANG, Qin; DU, Shijie; XU, Lu. A review of quantitative structure-activity relationship: The development and current status of data sets, molecular descriptors and mathematical models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. l.], v. 256, p. 105278, 2025. DOI: 10.1016/j.chemolab.2024.105278.

LI, Kai; CUI, Kanglong; WANG, Qi. Adverse outcome pathway network approach to identify endocrine disruptor-induced reproductive toxicity. **Current Opinion in Toxicology**, [S. l.], v. 34, p. 100391, 2023. DOI: 10.1016/j.cotox.2023.100391.

LUNDBERG, Scott; LEE, Su-In. **A Unified Approach to Interpreting Model Predictions**. arXiv, , 2017. DOI: 10.48550/arXiv.1705.07874. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/1705.07874>. Acesso em: 11 fev. 2025.

LUPU, Diana et al. The ENDpoiNTs Project: Novel Testing Strategies for Endocrine Disruptors Linked to Developmental Neurotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 3978, 2020. DOI: 10.3390/ijms21113978.

MA, Ya et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. **Environmental Research**, [S. l.], v. 176, p. 108575, 2019. DOI: 10.1016/j.envres.2019.108575.

MACLEAN, H. E.; WARNE, G. L.; ZAJAC, J. D. Localization of functional domains in the androgen receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 233–242, 1997. DOI: 10.1016/s0960-0760(97)00049-6.

MAHMOUD, Rana S.; YOUSEF, Ahmed H. Using Molecular Fingerprints as Descriptors in Toxicity Prediction: A Survey. *Em: 2019 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICINE (BIBM) 2019*, **Anais [...]**. *Em: 2019 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICINE (BIBM)*. [s.l.: s.n.] p. 2649–2654. DOI: 10.1109/BIBM47256.2019.8982990. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8982990>. Acesso em: 23 jul. 2024.

MAIN, Katharina M. et al. Human Breast Milk Contamination with Phthalates and Alterations of Endogenous Reproductive Hormones in Infants Three Months of Age. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 114, n. 2, p. 270–276, 2006. DOI: 10.1289/ehp.8075.

MANSOURI, Kamel et al. CERAPP: Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 124, n. 7, p. 1023–1033, 2016. DOI: 10.1289/ehp.1510267.

MANSOURI, Kamel et al. CoMPARA: Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 128, n. 2, p. 27002, 2020. DOI: 10.1289/EHP5580.

MARLATT, V. L. et al. Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans. **Environmental Research**, [S. l.], v. 208, p. 112584, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112584.

MARTIN, L.; CLARINGBOLD, P. J. The mitogenic action of oestrogens in the vaginal epithelium of the ovariectomized mouse. **The Journal of endocrinology**, [S. l.], v. 20, p. 173–186, 1960. DOI: 10.1677/joe.0.0200173.

MAURI, Andrea; CONSONNI, Viviana; TODESCHINI, Roberto. Molecular Descriptors. *Em*: LESZCZYNSKI, Jerzy; KACZMAREK-KEDZIERA, Anna; PUZYN, Tomasz; G. PAPAPOPOULOS, Manthos; REIS, Heribert; K. SHUKLA, Manoj (org.). **Handbook of Computational Chemistry**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 2065–2093. DOI: 10.1007/978-3-319-27282-5_51. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27282-5_51. Acesso em: 8 fev. 2025.

MÍNGUEZ-ALARCÓN, Lidia; GASKINS, Audrey J.; MEEKER, John D.; BRAUN, Joseph M.; CHAVARRO, Jorge E. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 120, n. 6, p. 1138–1149, 2023. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.10.008.

MOKRA, Katarzyna. Endocrine Disruptor Potential of Short- and Long-Chain Perfluoroalkyl Substances (PFASs)—A Synthesis of Current Knowledge with Proposal of Molecular Mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 2148, 2021. DOI: 10.3390/ijms22042148.

MUKHERJEE, Arpan; SU, An; RAJAN, Krishna. Deep Learning Model for Identifying Critical Structural Motifs in Potential Endocrine Disruptors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 2187–2197, 2021. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c01409.

MURATOV, Eugene N. et al. QSAR without borders. **Chemical Society reviews**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 3525–3564, 2020. DOI: 10.1039/d0cs00098a.

NEEDHAM, Larry L.; BLOUNT, Benjamin; ROGERS, Helen Schurz; BROCK, John W.; BARR, Dana. Levels of Selected Nonpersistent Endocrine Disruptors in Humans. *Em*: **Analysis of Environmental Endocrine Disruptors**. ACS Symposium Series[s.l.] : American Chemical Society, 1999. v. 747p. 147–157. DOI: 10.1021/bk-2000-0747.ch010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0747.ch010>. Acesso em: 1 ago. 2024.

NG, Raymond A.; GUAN, Jihua; ALFORD, Vernon C.; LANTER, James C.; ALLAN, George F.; SBRISCIA, Tifanie; LINTON, Olivia; LUNDEEN, Scott G.; SUI, Zhihua. Synthesis and SAR of potent and selective androgen receptor antagonists: 5,6-Dichloro-benzimidazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 784–788, 2007. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.10.071.

OECD. **Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2017. Disponível em:

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-for-the-use-of-adverse-outcome-pathways-in-developing-integrated-approaches-to-testing-and-assessment-iata_44bb06c1-en. Acesso em: 7 ago. 2024.

OECD. **Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2018. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-standardised-test-guidelines-for-evaluating-chemicals-for-endocrine-disruption-2nd-edition_9789264304741-en. Acesso em: 1 ago. 2024.

OLKER, Jennifer H. et al. The ECOTOXicology Knowledgebase: A Curated Database of Ecologically Relevant Toxicity Tests to Support Environmental Research and Risk Assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 1520–1539, 2022. DOI: 10.1002/etc.5324.

O'LONE, Raegan; FRITH, Martin C.; KARLSSON, Elinor K.; HANSEN, Ulla. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, [S. l.], v. 18, n. 8, p. 1859–1875, 2004. DOI: 10.1210/me.2003-0044.

OROSZ, Álmos; HÉBERGER, Károly; RÁCZ, Anita. Comparison of Descriptor- and Fingerprint Sets in Machine Learning Models for ADME-Tox Targets. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fchem.2022.852893. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2022.852893/full>. Acesso em: 23 jul. 2024.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G. G.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.; KUSHNER, P. J.; SCANLAN, T. S. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 277, n. 5331, p. 1508–1510, 1997. DOI: 10.1126/science.277.5331.1508.

PANAGIOTOU, Eleftheria M.; OJASALO, Venla; DAMDIMOPOULOU, Pauliina. Phthalates, ovarian function and fertility in adulthood. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 101552, 2021. DOI: 10.1016/j.beem.2021.101552.

PANDIT, Shraddha; SINGH, Prakrity; PARTHASARATHI, Ramakrishnan. Computational risk assessment framework for the hazard analysis of bisphenols and quinone metabolites. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 426, p. 128031, 2022. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.128031.

PETTOELLO-MANTOVANI, Massimo; MESTROVIC, Julije; NAMAZOVA-BARANOVA MD PHD, Leyla; GIARDINO, Ida; SOMEKH, Eli; VURAL, Mehmet. Ensuring Safe Food for Infants: The Importance of an Integrated Approach to Monitor and Reduce the Risks of Biological, Chemical, and Physical Hazards. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 229, p. 315- 316.e2, 2021. DOI: 10.1016/j.jpeds.2020.10.074.

PIAZZA, Mauri José; URBANETZ, Almir Antônio. Environmental toxins and the impact of other endocrine disrupting chemicals in women's reproductive health. **JBRA**

Assisted Reproduction, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 154–164, 2019. DOI: 10.5935/1518-0557.20190016.

RANA, Kesha; DAVEY, Rachel A.; ZAJAC, Jeffrey D. Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. **Asian Journal of Andrology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 169–177, 2014. DOI: 10.4103/1008-682X.122590.

RAVICHANDRAN, Janani; KARTHIKEYAN, Bagavathy Shanmugam; SAMAL, Areejit. Investigation of a derived adverse outcome pathway (AOP) network for endocrine-mediated perturbations. **The Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 826, p. 154112, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154112.

RAYSYAN, Anna; ZWIGART, Sandro D.; EREMIN, Sergei A.; SCHNEIDER, Rudolf J. BPA Endocrine Disruptor Detection at the Cutting Edge: FPIA and ELISA Immunoassays. **Biosensors**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 664, 2023. DOI: 10.3390/bios13060664.

RICHARD, Ann M. et al. ToxCast Chemical Landscape: Paving the Road to 21st Century Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 29, n. 8, p. 1225–1251, 2016. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00135.

RICHARD, Ann M. et al. The Tox21 10K Compound Library: Collaborative Chemistry Advancing Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 189–216, 2021. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00264.

RODRIGUEZ, Kelvin J. Santana; VILLENEUVE, Daniel L.; JENSEN, Kathleen M.; ANKLEY, Gerald T.; MILLER, David H. **Adverse Outcome Pathway on Androgen receptor agonism leading to male-biased sex ratio**. Paris: OECD, 2023. DOI: 10.1787/6f60dce3-en. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/adverse-outcome-pathway-on-androgen-receptor-agonism-leading-to-male-biased-sex-ratio_6f60dce3-en. Acesso em: 8 ago. 2024.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, Raquel; BAJORATH, Jürgen. Interpretation of Compound Activity Predictions from Complex Machine Learning Models Using Local Approximations and Shapley Values. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 16, p. 8761–8777, 2020. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01101.

ROGERS, David; HAHN, Mathew. Extended-Connectivity Fingerprints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 742–754, 2010. DOI: 10.1021/ci100050t.

ROTROFF, Daniel M. et al. Predictive Endocrine Testing in the 21st Century Using in Vitro Assays of Estrogen Receptor Signaling Responses. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 48, n. 15, p. 8706–8716, 2014. DOI: 10.1021/es502676e.

ROY, Kunal; KAR, Supratik; AMBURE, Pravin. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. l.], v. 145, p. 22–29, 2015. DOI: 10.1016/j.chemolab.2015.04.013.

SAFAVIAN, S. R.; LANDGREBE, D. A survey of decision tree classifier methodology. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 660–674, 1991. DOI: 10.1109/21.97458.

SAHU, Sumanta Kumar; OJHA, Krishna Kumar. Applications of QSAR study in drug design of tubulin binding inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, [S. l.], p. 1–16, 2023. DOI: 10.1080/07391102.2023.2273437.

SAMUEL, A. L. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. **IBM Journal of Research and Development**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 210–229, 1959. DOI: 10.1147/rd.33.0210.

SANDER, Thomas; FREYSS, Joel; VON KORFF, Modest; RUFENER, Christian. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 460–473, 2015. DOI: 10.1021/ci500588j.

SAPOUNIDOU, Maria; NORINDER, Ulf; ANDERSSON, Patrik L. Predicting Endocrine Disruption Using Conformal Prediction – A Prioritization Strategy to Identify Hazardous Chemicals with Confidence. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 53–65, 2022. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.2c00267.

SCHEIDEREIT, C.; KRAUTER, P.; VON DER AHE, D.; JANICH, S.; RABENAU, O.; CATO, A. C.; SUSKE, G.; WESTPHAL, H. M.; BEATO, M. Mechanism of gene regulation by steroid hormones. **Journal of Steroid Biochemistry**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 19–24, 1986. DOI: 10.1016/0022-4731(86)90026-9.

SCHWABE, John W. R.; TEICHMANN, Sarah A. Nuclear receptors: the evolution of diversity. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, [S. l.], v. 2004, n. 217, p. pe4, 2004. DOI: 10.1126/stke.2172004pe4.

SHEHAB, Zakariya Nafi'; JAMIL, Nor Rohaizah; ARIS, Ahmad Zaharin. Occurrence, environmental implications and risk assessment of Bisphenol A in association with colloidal particles in an urban tropical river in Malaysia. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 20360, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-77454-8.

SILVA, Ana Beatriz P.; CARREIRÓ, Filipa; RAMOS, Fernando; SANCHES-SILVA, Ana. The role of endocrine disruptors in female infertility. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 7069–7088, 2023. DOI: 10.1007/s11033-023-08583-2.

SINGH, Samvedna; GUPTA, Himanshi; SHARMA, Priyanshu; SAHI, Shakti. Advances in Artificial Intelligence (AI)-assisted approaches in drug screening. **Artificial Intelligence Chemistry**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 100039, 2024. DOI: 10.1016/j.aichem.2023.100039.

SINHA, Krishnendu; GHOSH, Nabanita; SIL, Parames C. A Review on the Recent Applications of Deep Learning in Predictive Drug Toxicological Studies. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 1174–1205, 2023. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.2c00375.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 972–978, 2001. DOI: 10.1093/humrep/16.5.972.

SNOEK, Jasper; LAROCHELLE, Hugo; ADAMS, Ryan P. Practical Bayesian Optimization of Machine Learning Algorithms. *Em: ADVANCES IN NEURAL INFORMATION PROCESSING SYSTEMS 2012*, **Anais [...]**. : Curran Associates, Inc., 2012. Disponível em: <https://proceedings.neurips.cc/paper/2012/hash/05311655a15b75fab86956663e1819cd-Abstract.html>. Acesso em: 26 ago. 2024.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K. L.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N.; OLEA SERRANO, F. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 103, n. SUPPL. 7, p. 113–122, 1995. DOI: 10.1289/ehp.95103s7113.

SOUTER, Irene; SMITH, Kristen W.; DIMITRIADIS, Irene; EHRlich, Shelley; WILLIAMS, Paige L.; CALAFAT, Antonia M.; HAUSER, Russ. The Association of Bisphenol-A Urinary Concentrations with Antral Follicle Counts and Other Measures of Ovarian Reserve in Women Undergoing Infertility Treatments. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, [S. l.], v. 42, p. 224–231, 2013. DOI: 10.1016/j.reprotox.2013.09.008.

STEVENS, Sarah; MCPARTLAND, Molly; BARTOSOVA, Zdenka; SKÅLAND, Hanna Sofie; VÖLKER, Johannes; WAGNER, Martin. Plastic Food Packaging from Five Countries Contains Endocrine- and Metabolism-Disrupting Chemicals. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 58, n. 11, p. 4859–4871, 2024. DOI: 10.1021/acs.est.3c08250.

TAN, Haoyue; CHEN, Qinchang; HONG, Huixiao; BENFENATI, Emilio; GINI, Giuseppina C.; ZHANG, Xiaowei; YU, Hongxia; SHI, Wei. Structures of Endocrine-Disrupting Chemicals Correlate with the Activation of 12 Classic Nuclear Receptors. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 55, n. 24, p. 16552–16562, 2021. DOI: 10.1021/acs.est.1c04997.

TAN, Haoyue; WU, Jinqiu; ZHANG, Rong; ZHANG, Chi; LI, Wei; CHEN, Qinchang; ZHANG, Xiaowei; YU, Hongxia; SHI, Wei. Development, Validation, and Application of a Human Reproductive Toxicity Prediction Model Based on Adverse Outcome Pathway. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 56, n. 17, p. 12391–12403, 2022. DOI: 10.1021/acs.est.2c02242.

TERZAGHI, Elisa; ALBERTI, Elena; RASPA, Giuseppe; ZANARDINI, Elisabetta; MOROSINI, Cristiana; ANELLI, Simone; ARMIRAGLIO, Stefano; DI GUARDO, Antonio. A new dataset of PCB half-lives in soil: Effect of plant species and organic carbon addition on biodegradation rates in a weathered contaminated soil. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 750, p. 141411, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141411.

THE LANCET ONCOLOGY, Null. Endocrine disruptors-the lessons (not) learned. **The Lancet. Oncology**, [S. l.], v. 22, n. 11, p. 1483, 2021. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00597-0.

TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana. **Handbook of Molecular Descriptors**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2008.

TROPSHA, Alexander. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. **Molecular Informatics**, [S. l.], v. 29, n. 6–7, p. 476–488, 2010. DOI: 10.1002/minf.201000061.

TRUSS, M.; BEATO, M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 459–479, 1993. DOI: 10.1210/edrv-14-4-459.

TŮRKOVÁ, Alžběta; JAIN, Sankalp; ZDRAZIL, Barbara. Integrative Data Mining, Scaffold Analysis, and Sequential Binary Classification Models for Exploring Ligand Profiles of Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 59, n. 5, p. 1811–1825, 2019. DOI: 10.1021/acs.jcim.8b00466.

US EPA, OCSPP. **Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Universe of Chemicals and General Validation Principles**. Other Policies and Guidance. 2015a. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-universe-chemicals-and-general>. Acesso em: 23 jun. 2024.

US EPA, OCSPP. **Uterotrophic Assay SEP and DEST**. Other Policies and Guidance. 2015b. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/uterotrophic-assay-sep-and-dest>. Acesso em: 23 jun. 2024.

VAN DEN BERG, Henk. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 16, p. 575–590, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000200021>.

VARTICOVSKI, L.; STAVREVA, DA.; MCGOWAN, A.; RAZIUDDIN, R.; HAGER, GL. Endocrine Disruptors of Sex Hormone Activities. **Molecular and cellular endocrinology**, [S. l.], v. 539, p. 111415, 2022. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111415.

VILLENEUVE, Daniel L. et al. Case Study in 21st-Century Ecotoxicology: Using In Vitro Aromatase Inhibition Data to Predict Reproductive Outcomes in Fish In Vivo. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 100–116, 2023. DOI: 10.1002/etc.5504.

VO, Andy H.; VAN VLEET, Terry R.; GUPTA, Rishi R.; LIGUORI, Michael J.; RAO, Mohan S. An Overview of Machine Learning and Big Data for Drug Toxicity Evaluation. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 20–37, 2020. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00227.

WAMS, T. J. Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant--a review. **The Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 66, p. 1–16, 1987. DOI: 10.1016/0048-9697(87)90072-6.

WANG, Marcus W. H.; GOODMAN, Jonathan M.; ALLEN, Timothy E. H. Machine Learning in Predictive Toxicology: Recent Applications and Future Directions for Classification Models. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 217–239, 2021. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00316.

WANG, Shengzheng; DONG, Guoqiang; SHENG, Chunquan. Structural simplification: an efficient strategy in lead optimization. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 880–901, 2019. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.05.004.

WEI, Michael S.; KEMPERMAN, Robin H. J.; PALUMBO, Michelle A.; YOST, Richard A. Separation of Structurally Similar Anabolic Steroids as Cation Adducts in FAIMS-MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 355–365, 2020. DOI: 10.1021/jasms.9b00127.

WEININGER, David. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 31–36, 1988. DOI: 10.1021/ci00057a005.

WILKENFELD, Sandi R.; LIN, Chenchu; FRIGO, Daniel E. Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. **Steroids**, FASEB SRC – Steroid Signaling in Health and Disease. [S. l.], v. 133, FASEB SRC – Steroid Signaling in Health and Disease, p. 2–7, 2018. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.11.005.

WU, Xiaotong; ZHOU, Qixing; MU, Li; HU, Xiangang. Machine learning in the identification, prediction and exploration of environmental toxicology: Challenges and perspectives. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 438, p. 129487, 2022. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129487.

XUE, L.; BAJORATH, J. Molecular descriptors in chemoinformatics, computational combinatorial chemistry, and virtual screening. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 363–372, 2000. DOI: 10.2174/1386207003331454.

YU, Tianshi; NANTASENAMAT, Chanin; KACHENTON, Supicha; ANUWONGCHAROEN, Nuttapat; PIACHAM, Theeraphon. Cheminformatic Analysis and Machine Learning Modeling to Investigate Androgen Receptor Antagonists to Combat Prostate Cancer. **ACS Omega**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 6729–6742, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.2c07346.

ZDRAZIL, Barbara et al. The ChEMBL Database in 2023: a drug discovery platform spanning multiple bioactivity data types and time periods. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 52, n. D1, p. D1180–D1192, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkad1004.

ZHANG, Liying; SEDYKH, Alexander; TRIPATHI, Ashutosh; ZHU, Hao; AFANTITIS, Antreas; MOUCLIS, Varnavas D.; MELAGRAKI, Georgia; RUSYN, Ivan; TROPSHA, Alexander. Identification of putative estrogen receptor-mediated endocrine disrupting chemicals using QSAR- and structure-based virtual screening approaches. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 272, n. 1, p. 67–76, 2013. DOI: 10.1016/j.taap.2013.04.032.

ZHU, Hao; ZHANG, Jun; KIM, Marlene T.; BOISON, Abena; SEDYKH, Alexander; MORAN, Kimberlee. Big Data in Chemical Toxicity Research: The Use of High-Throughput Screening Assays To Identify Potential Toxicants. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 1643–1651, 2014. DOI: 10.1021/tx500145h.

ZILLIACUS, Johanna; DRASKAU, Monica K.; JOHANSSON, Hanna K. L.; SVINGEN, Terje; BERONIUS, Anna. Building an adverse outcome pathway network for estrogen-, androgen- and steroidogenesis-mediated reproductive toxicity. **Frontiers in Toxicology**, [S. l.], v. 6, 2024. DOI: 10.3389/ftox.2024.1357717. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/toxicology/articles/10.3389/ftox.2024.1357717/full>. Acesso em: 7 ago. 2024.

