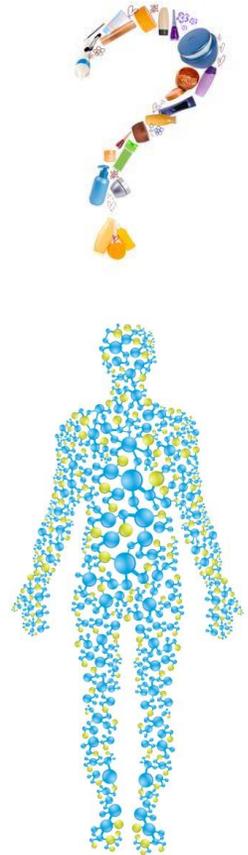
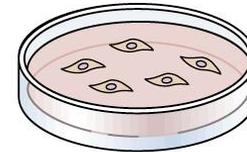




**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE



**Prof. Dr. Mauricio Yonamine**

# PANORAMA ATUAL

Cerca de 50 milhões de substâncias (orgânicas e inorgânicas) registradas no CAS.

- metais, praguicidas, solventes, fármacos, corantes, aditivos alimentares etc.

Nos Estados Unidos, são registradas cerca de 1000 substâncias por ano.

No mundo, mais de 3.000 compostos são produzidos em larga escala (mais de 500 ton. por ano).



*“Se nós vamos conviver tão intimamente com essas substâncias – ingerindo e bebendo essas substâncias; colocando-as para dentro de nossas medulas – nós deveríamos conhecer melhor sua natureza e seu poder.”*



Rachel Carson (1907-1964),  
ambientalista, escritora  
*Silent Spring*, 1962

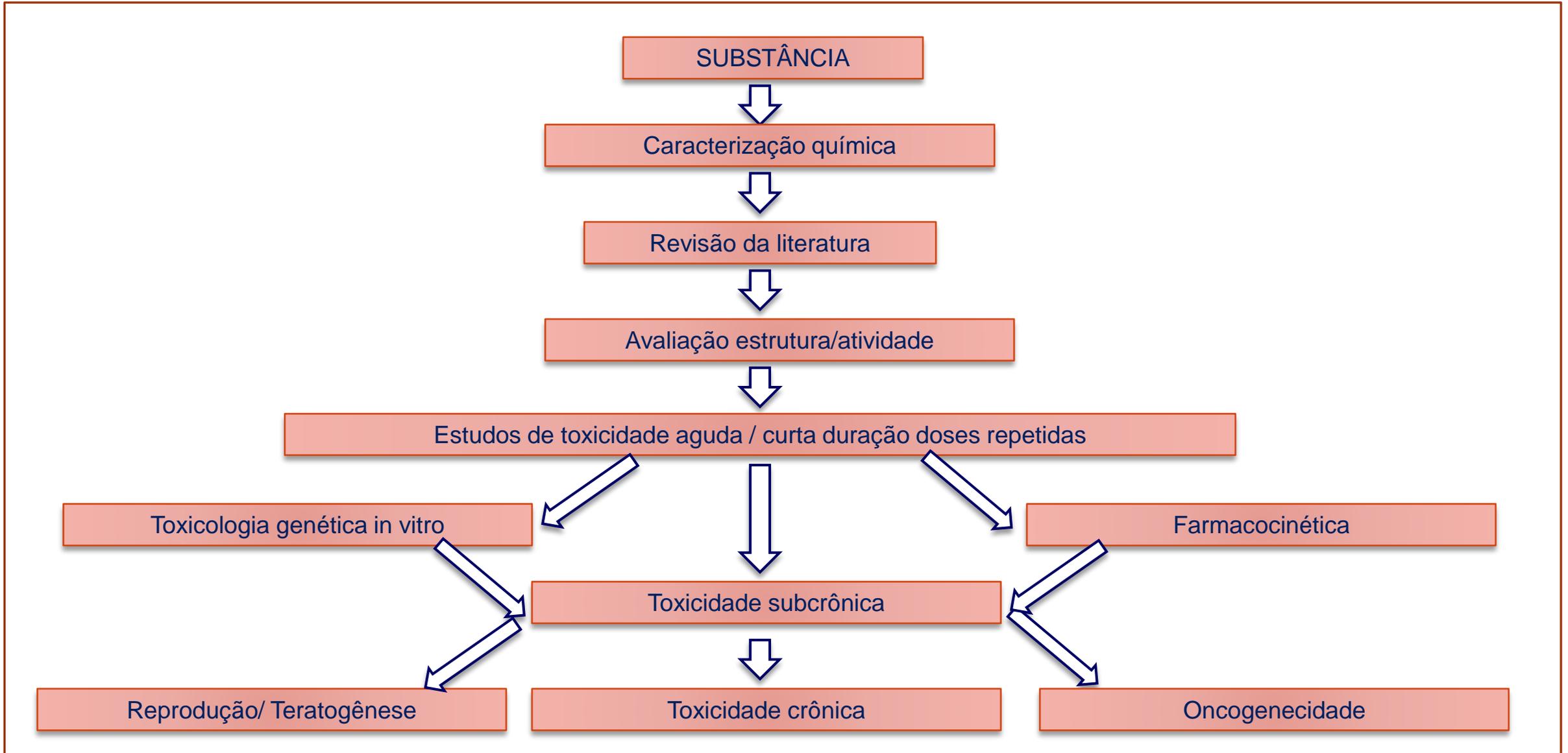
# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Compreende a análise dos dados toxicológicos de uma substância com o objetivo de classificá-la quimicamente.

## Dados toxicológicos:

- ❑ Experimentação em animais de laboratório;
- ❑ Ensaios '*in vitro*';
- ❑ Estudos epidemiológicos;
- ❑ Estudos ecotoxicológicos;
- ❑ Estudos preditivos '*in silico*'.

# ESQUEMA DE TESTES TOXICOLÓGICOS DE NOVAS SUBSTÂNCIAS



# TESTES DE TOXICIDADE/ AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA

O *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) inclui autoridades da Europa, Japão e Estados Unidos.

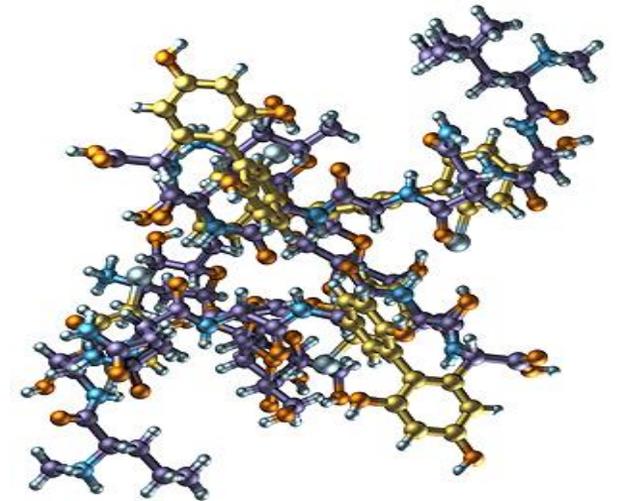
Carcinogenicity Studies S1A - S1C	▼
Genotoxicity Studies S2	▼
Toxicokinetics and Pharmacokinetics S3A - S3B	▼
Toxicity Testing S4	▼
Reproductive Toxicology S5	▼
Biotechnological Products S6	▼
Pharmacology Studies S7A - S7B	▼
Immunotoxicology Studies S8	▼
Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals S9	▼
Photosafety Evaluation S10	▼
Cross-cutting Topics	▼



# INFORMAÇÕES PRELIMINARES

Compreende a avaliação química da substância a ser avaliada.

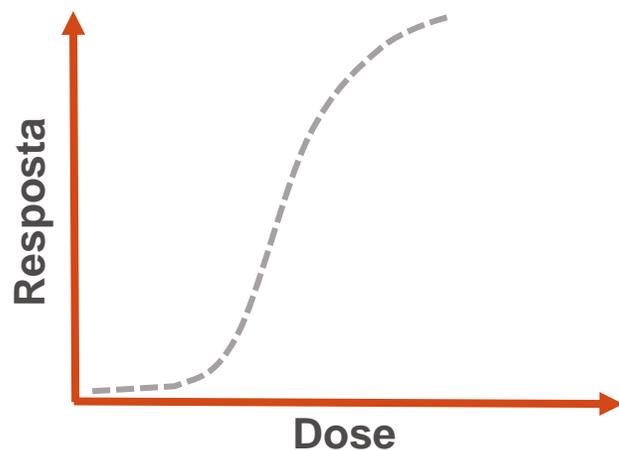
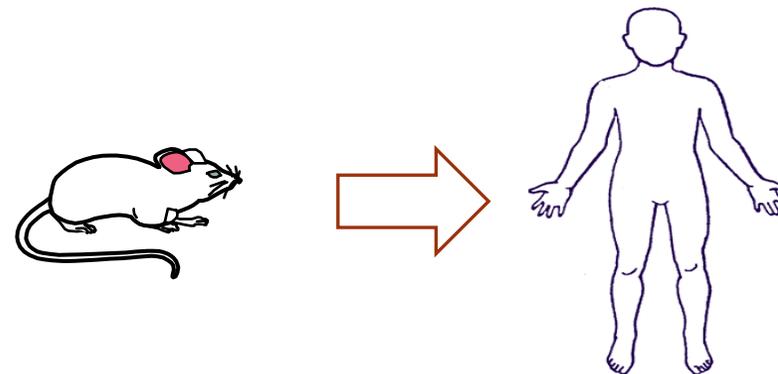
- ❑ Estrutura química
- ❑ Impurezas
- ❑ Estabilidade
- ❑ Solubilidade (hidrossolúvel/lipossolúvel)
- ❑ Volatilidade



# EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Dois **PRINCÍPIOS** são enfatizados nos testes descritivos de toxicidade animal:

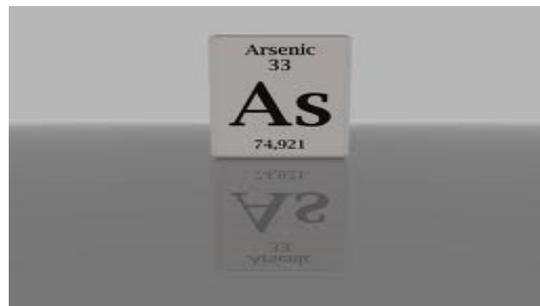
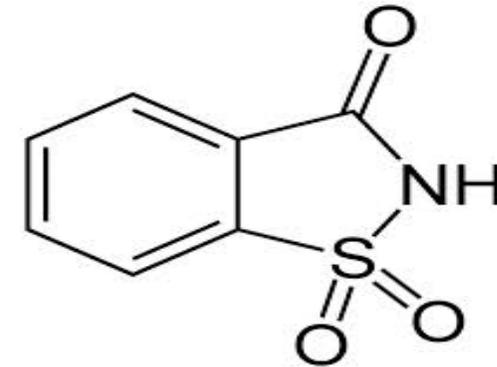
- Os efeitos produzidos por uma substância em animais de laboratório, quando devidamente quantificados, são aplicáveis em humanos.



- A exposição em animais em altas doses é um necessário e válido método de descobrir possíveis danos em humanos. Este princípio é baseado no conceito dose-resposta quantal em que a incidência de um efeito na população é maior com o aumento da dose.

# PROBLEMAS NA EXTRAPOLAÇÃO ANIMAL X HUMANOS:

- Ratos alimentados com altas doses de sacarina desenvolvem tumor de bexiga. A precipitação de sacarina na urina no homem não acontece mesmo com o uso de concentrações extraordinariamente altas.



- Por outro lado, estudos com animais expostos ao As, não mostraram carcinogenicidade. Estudos epidemiológicos demonstram suficiente evidência de carcinogenicidade em humanos.

# EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

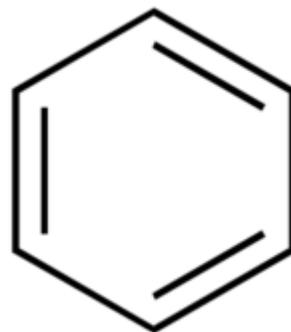
## DURAÇÃO E FREQUÊNCIA DE EXPOSIÇÃO

- Exposição aguda: até 24 horas (geralmente até 4 horas)
- Exposição subaguda: exposições repetidas até 1 mês
- Exposição subcrônica: de 1 a 3 meses
- Exposição crônica: mais de 3 meses.



# EXPOSIÇÃO AGUDA X CRÔNICA

Exemplo:

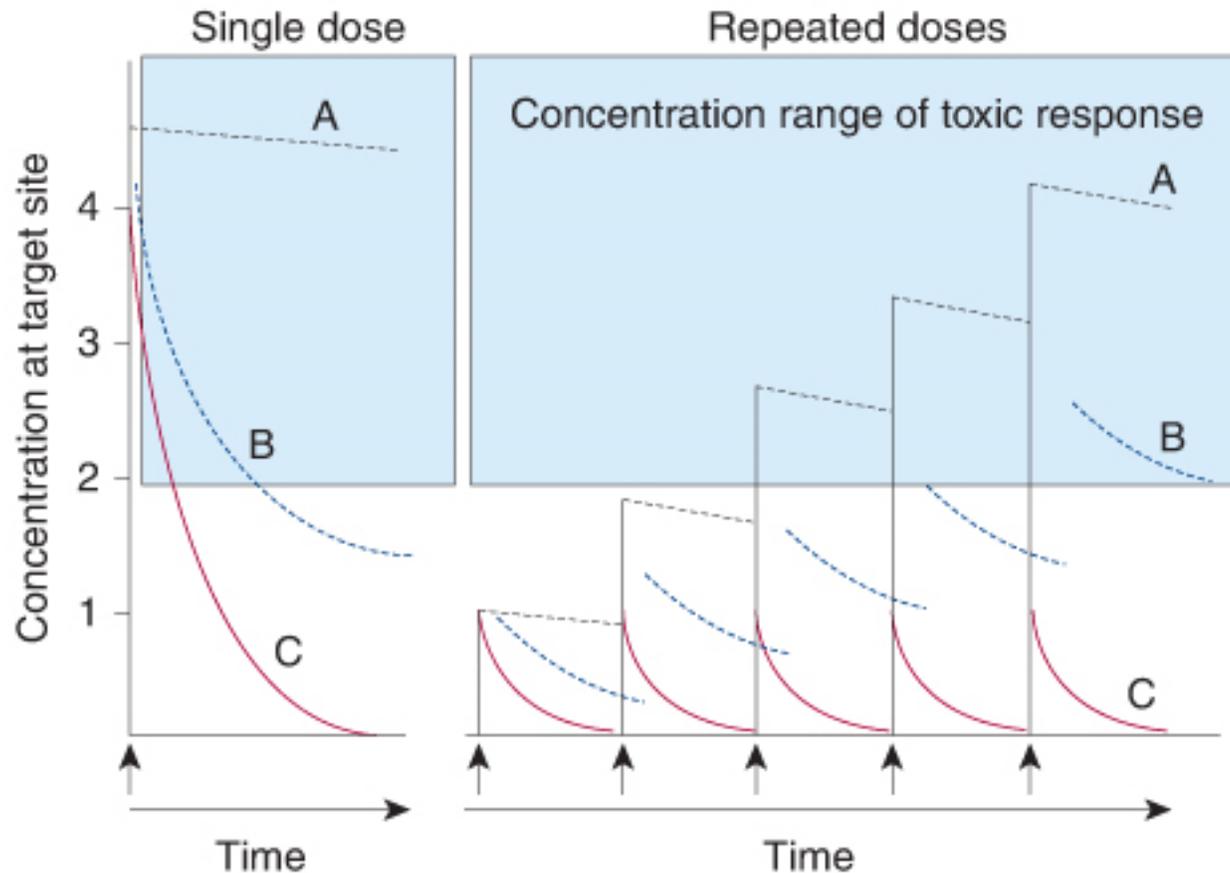


benzeno

Exposição aguda:  
depressão no SNC

Exposição crônica:  
mielotoxicidade - leucemia

# ADMINISTRAÇÃO SIMPLES X REPETIDA



Acúmulo de dose ou acúmulo de efeito

Substância A: meia-vida alta de eliminação (ex. 1 ano);  
Substância B: substância com meia-vida de eliminação igual à frequência de doses (ex. 1 dia);  
Substância C: taxa de eliminação mais rápida que a frequência de doses.

# RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA

- A relação dose/ resposta descreve a relação entre as características de exposição e o espectro de efeitos tóxicos. Um aspecto importante a considerar é que uma substância pode apresentar diferentes locais de ação tóxica no organismo, tendo para cada local, diferentes relações dose-resposta.

# RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA

Para o estabelecimento da curva dose-resposta, os seguintes paradigmas devem ser assumidos:

- A resposta é inequivocadamente gerada pela administração da substância (relação causa-efeito);
- A intensidade da resposta está relacionada com a dose;
- A avaliação da resposta é feita por métodos quantificáveis e expressa a toxicidade.

# RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA

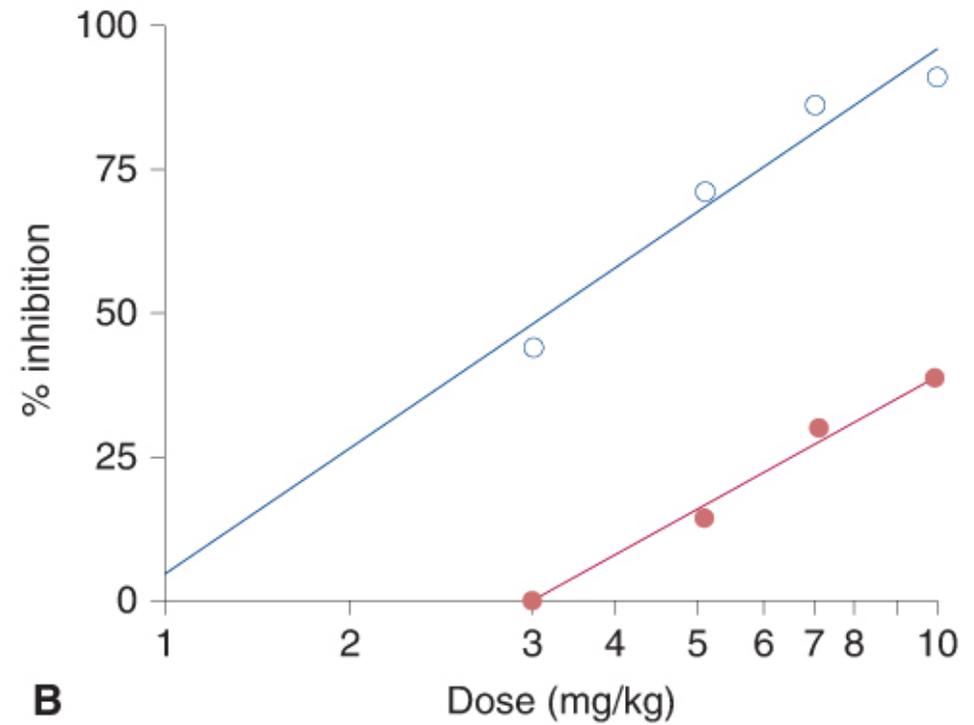
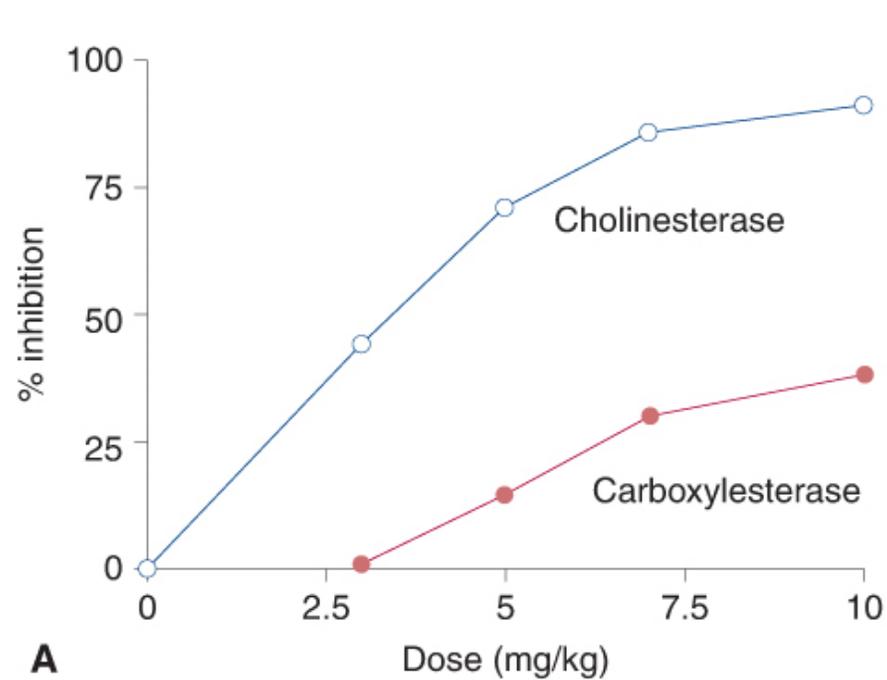
Como exemplo de viés, pode-se citar a redução de peso corpóreo de animais em um experimento com dietas contendo a substância em teste. Se a substância alterar a palatabilidade da ração, a redução de peso pode ocorrer simplesmente por redução da ingesta e, neste caso, a redução de peso não deve ser considerada um efeito adverso.

# RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA

Há dois tipos de relação dose/resposta:

- 1) Dose/ resposta individual ou 'graduada': descreve a resposta individual de um organismo a doses variadas de uma substância, geralmente referenciada como 'graduada' porque a medida de efeito é contínua.
- 2) Dose/ resposta quantal: caracteriza a distribuição de respostas populacionais a diferentes doses de uma substância.

## RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA 'GRADUADA'



Relação dose/ resposta entre diferentes doses de clorpirifós na atividade de esterases no cérebro (colinesterase) e no fígado (carboxilesterase) de ratos.

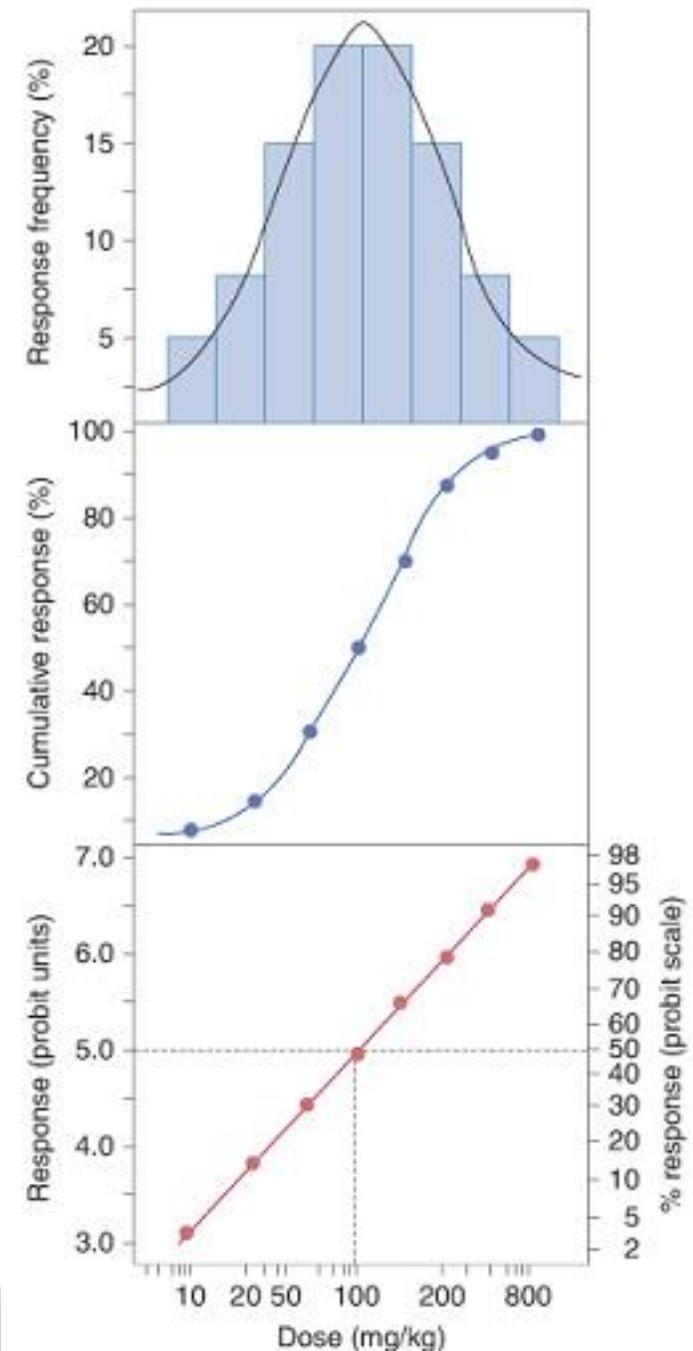
Lassiter et al., 1999.

# RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA QUANTAL

A relação dose/ resposta em uma população é, por definição, quantal – ‘tudo ou nada’, em que os indivíduos são classificados como ‘respondedores’ ou ‘não respondedores’.

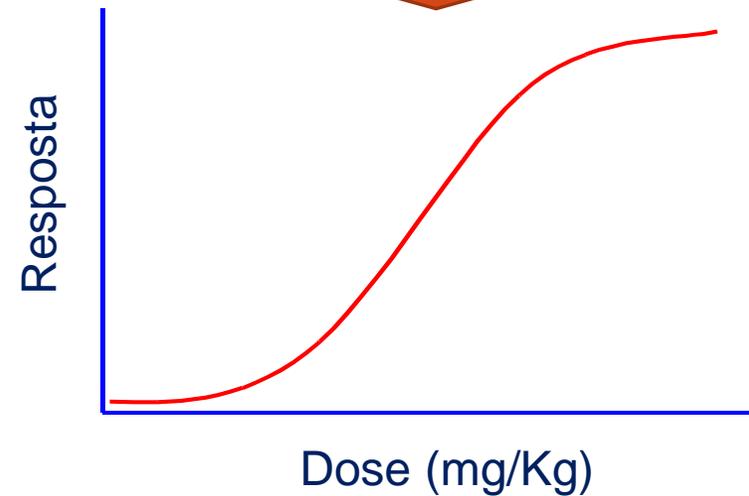
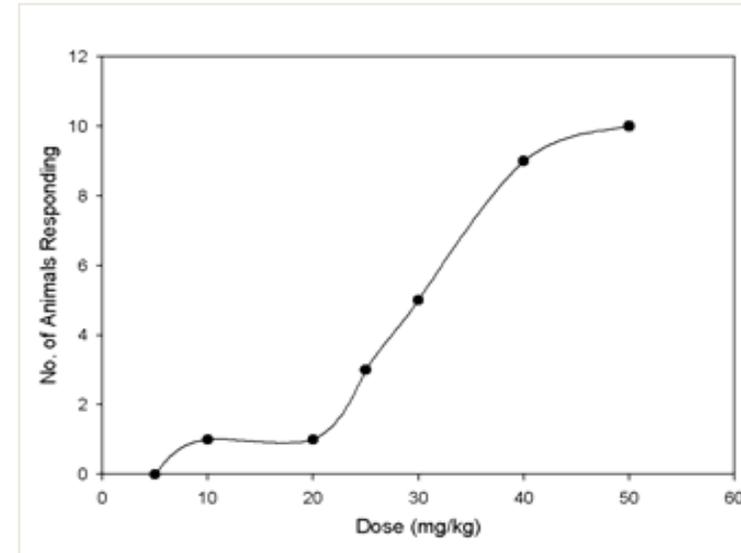
- Resposta em frequência (distribuição normal)
- Resposta cumulativa
- Probit
  
- $ED_{50}$  (dose efetiva 50%);  $ED_{10}$ ;  $ED_{30}$ ...
- $LD_{50}$  (dose letal 50%)

Obs: mesmo variáveis contínuas podem ser convertidas em resposta quantal

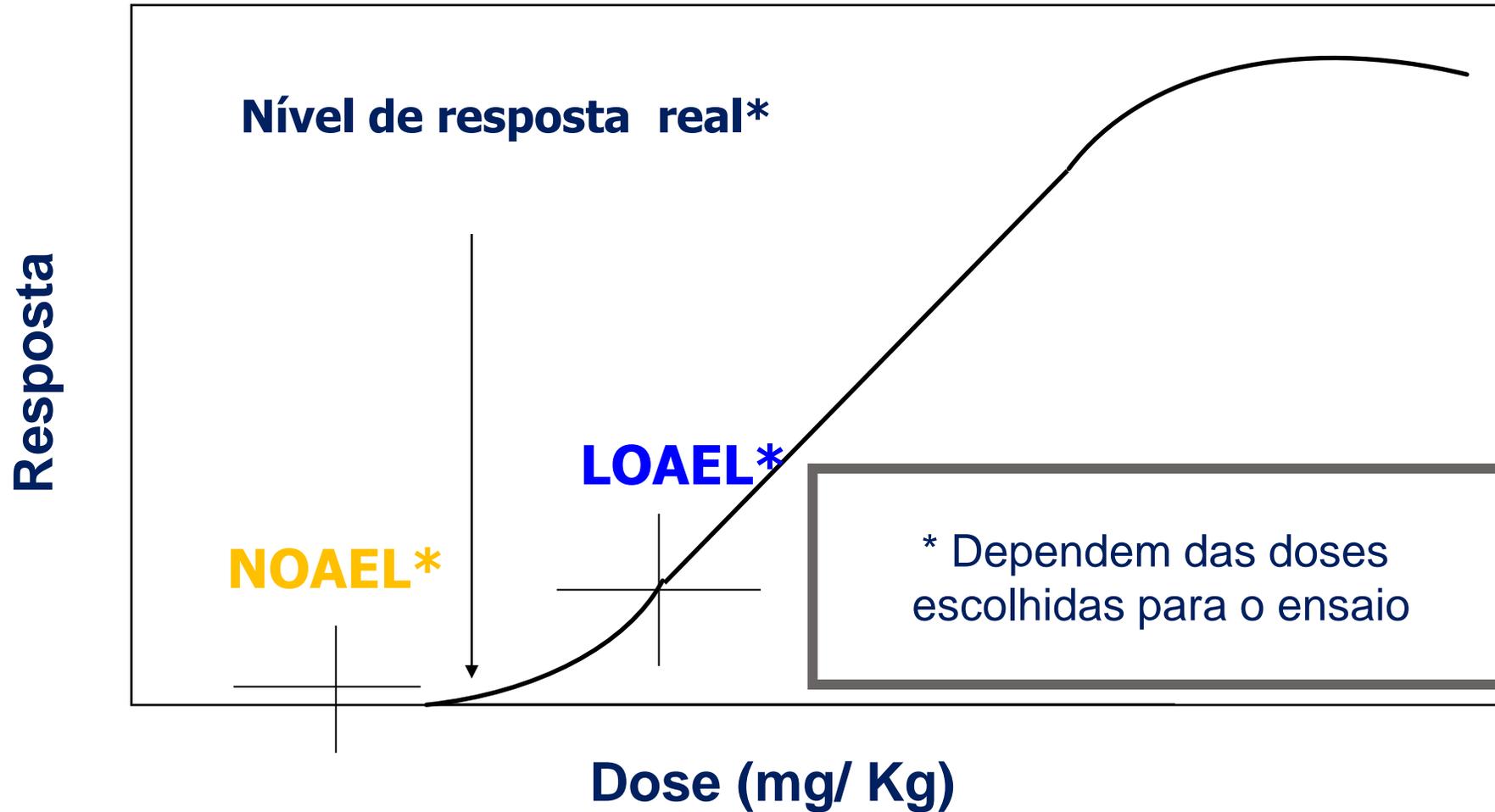


# Exemplo de relação dose/resposta

Dose Mg/kg	Resposta n. de animais
5	0
10	1
20	1
25	3
30	5
40	9
50	10



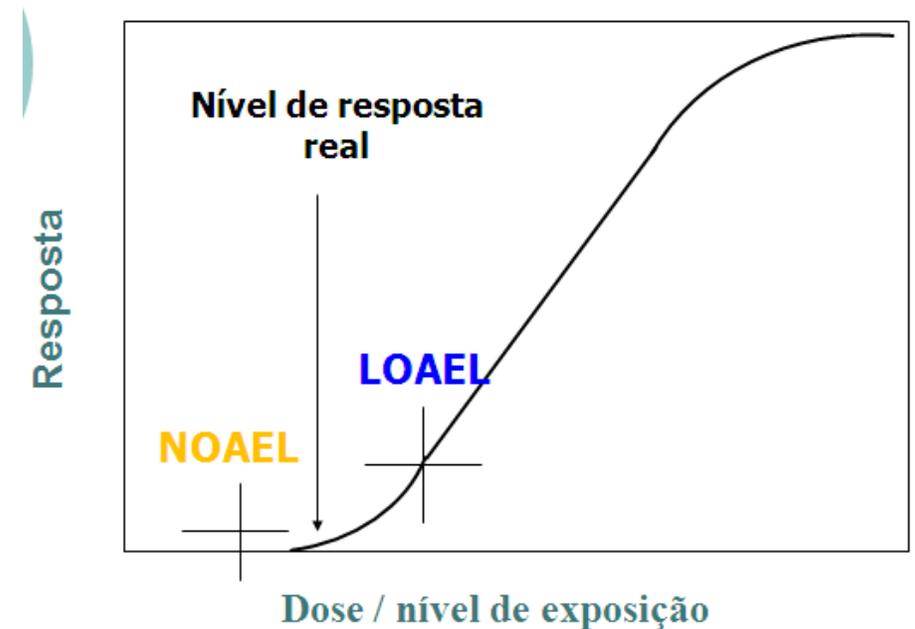
# Outros conceitos derivados da relação dose/resposta



# Outros conceitos derivados da relação dose/resposta

**NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*):** maior dose de uma substância-teste na qual não são observados efeitos adversos em animais de experimentação, expressa em miligramas por quilograma de peso corpóreo por dia (mg/kg p.c./dia)

**LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*):** menor dose de uma substância na qual são observados efeitos adversos em animais de experimentação, expressa em miligramas por quilograma de peso corpóreo por dia (mg/kg p.c./dia).



## LD<sub>50</sub> de algumas substâncias:

Substância	LD <sub>50</sub> (mg/Kg)
Etanol	10.000
Cloreto de sódio	4.000
Sulfato ferroso	1.500
Morfina	900
Fenobarbital	150
Estricnina	2
Nicotina	1
Tubocurarina	0,5
Tetrodotoxina	0,1
Dioxina	0,001
Toxina botulínica	0,00001

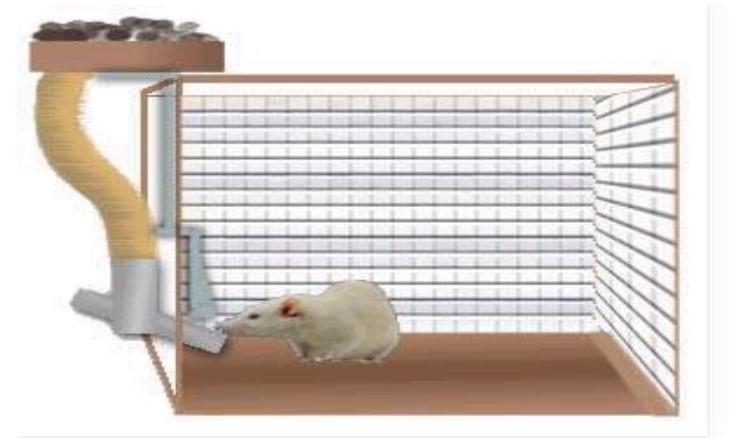
Obs: Maioria dos valores baseados em ratos, etanol e NaCl em camundongos, dioxina em porquinhos da Índia.

# ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA

Variáveis que influenciam os resultados da LD50

1) Quanto às instalações e fatores periódicos:

- Tipo de gaiola
- Temperatura ambiente
- Umidade relativa do ar
- Duração do período de adaptação
- Ciclo dia e noite
- Qualidade da ração do animal



# ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA

Variáveis que influenciam os resultados da LD50

## 2) Quanto ao agente tóxico

- Via de administração
- Veículo empregado na administração
- Volume de administração
- Velocidade de administração
- Impurezas



# VIAS DE ABSORÇÃO IMPORTANTES NA TOXICOLOGIA

**Oral** - medicamentos, alimentos, fármacos ou drogas de abuso; poluentes da atmosfera (ambiental, ocupacional).

**Pulmonar** – poluentes, solventes, praguicidas (ambiental e ocupacional), monóxido de carbono, gases asfixiantes (guerra, crimes, suicídios).

**Dérmica** – agentes ocupacionais, poluentes, medicamentos, agentes irritantes.

**Intravenosa** - medicamentos (anestésicos), fármacos ou drogas de abuso.

# ESTUDOS DE ABSORÇÃO: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

DÉRMICA

INTRAMUSCULAR

INTRAPERITONEAL

INTRAVENOSA

ORAL

SUBCUTÂNEA

INALATÓRIA

Ordem de efetividade geral das diferentes vias de administração



# ESTUDOS DE ABSORÇÃO: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Importância: exemplos

a) Comparação de doses tóxicas por diferentes vias de absorção:

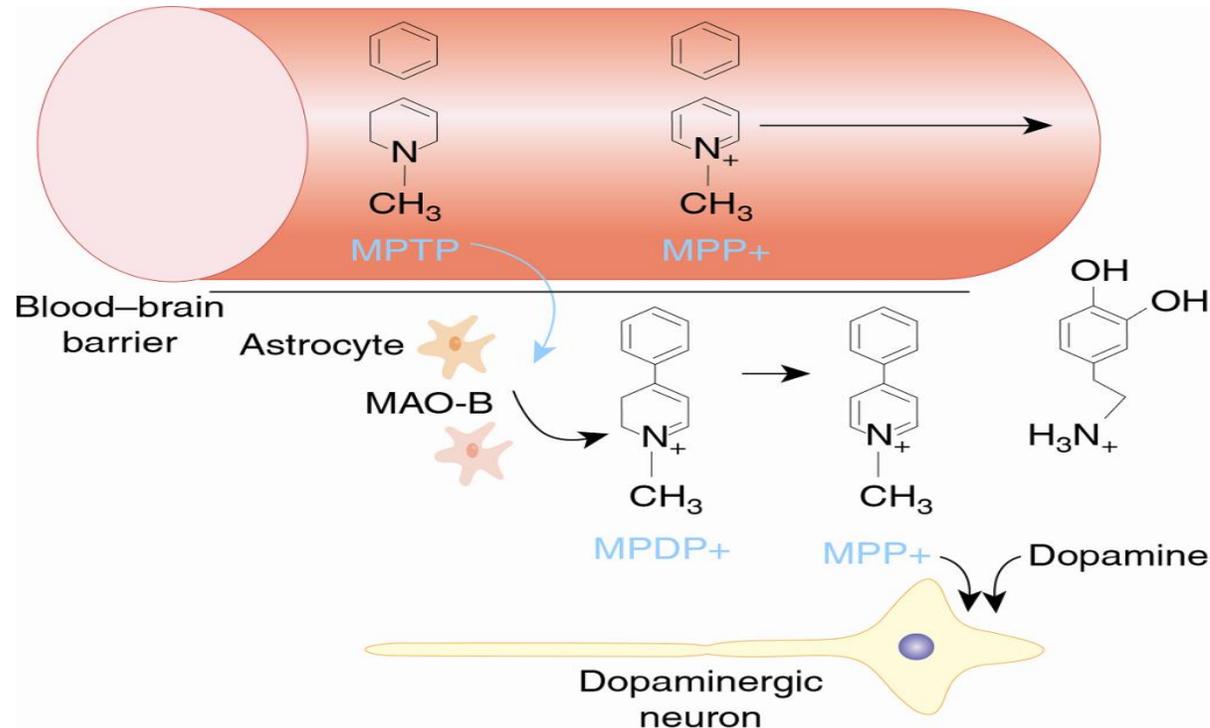
- Se a dose tóxica após administração oral ou dérmica for semelhante à intravenosa, pressupõe-se que o agente tóxico é totalmente e rapidamente absorvido.
- Por outro lado, se a dose administrada pela via dérmica for muito maior que a via oral, significa que a pele representa barreira efetiva para este composto.

b) Se um agente age no SNC, mas é eficientemente destoxificado no fígado, é esperado que ele seja menos tóxico quando administrado oralmente do que pela via inalatória, por exemplo.

# IMPUREZAS

➤ Às vezes, efeitos tóxicos mais graves são devidos a impurezas.

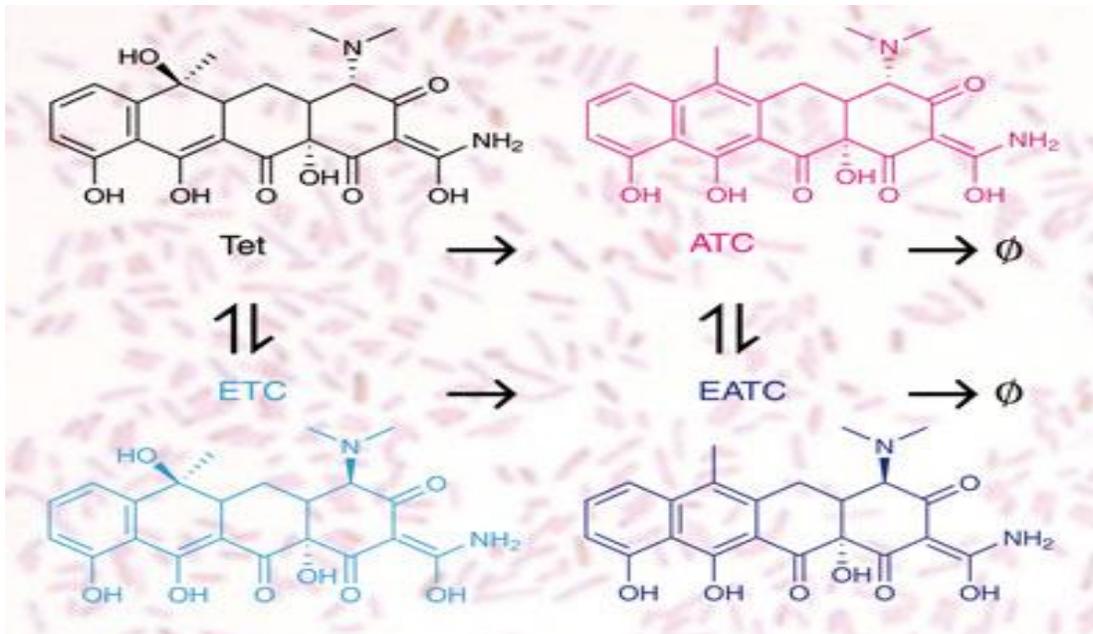
Ex: 1-methyl-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), subproduto da síntese de desmetilprodina (opioide).



MPP<sup>+</sup> é neurotóxica e produz efeitos semelhantes à doença de Parkinson.

# PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

- Fármacos também podem produzir produtos de degradação tóxicos.  
Ex: tetraciclina degrada à anidrotetraciclina (ATC) e epianidrotetraciclina (EATC).



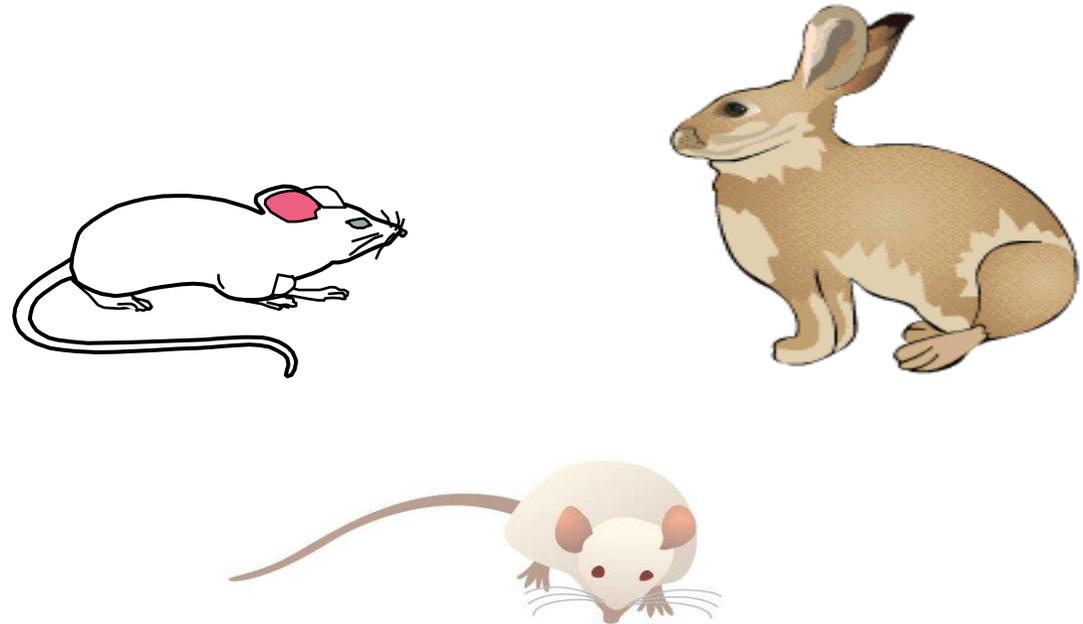
Síndrome de Fanconi, caracterizada por tubulopatia renal proximal: distúrbio na reabsorção de glicose, a.a., fosfato, bicarbonato e potássio.

# ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA

Variáveis que influenciam os resultados da LD50

3) Quanto aos animais de experimentação:

- Espécie
- Linhagem
- Idade
- Sexo
- Estado nutricional
- Estado patológico



# VARIAÇÃO NA RESPOSTA TÓXICA ENTRE ESPÉCIES

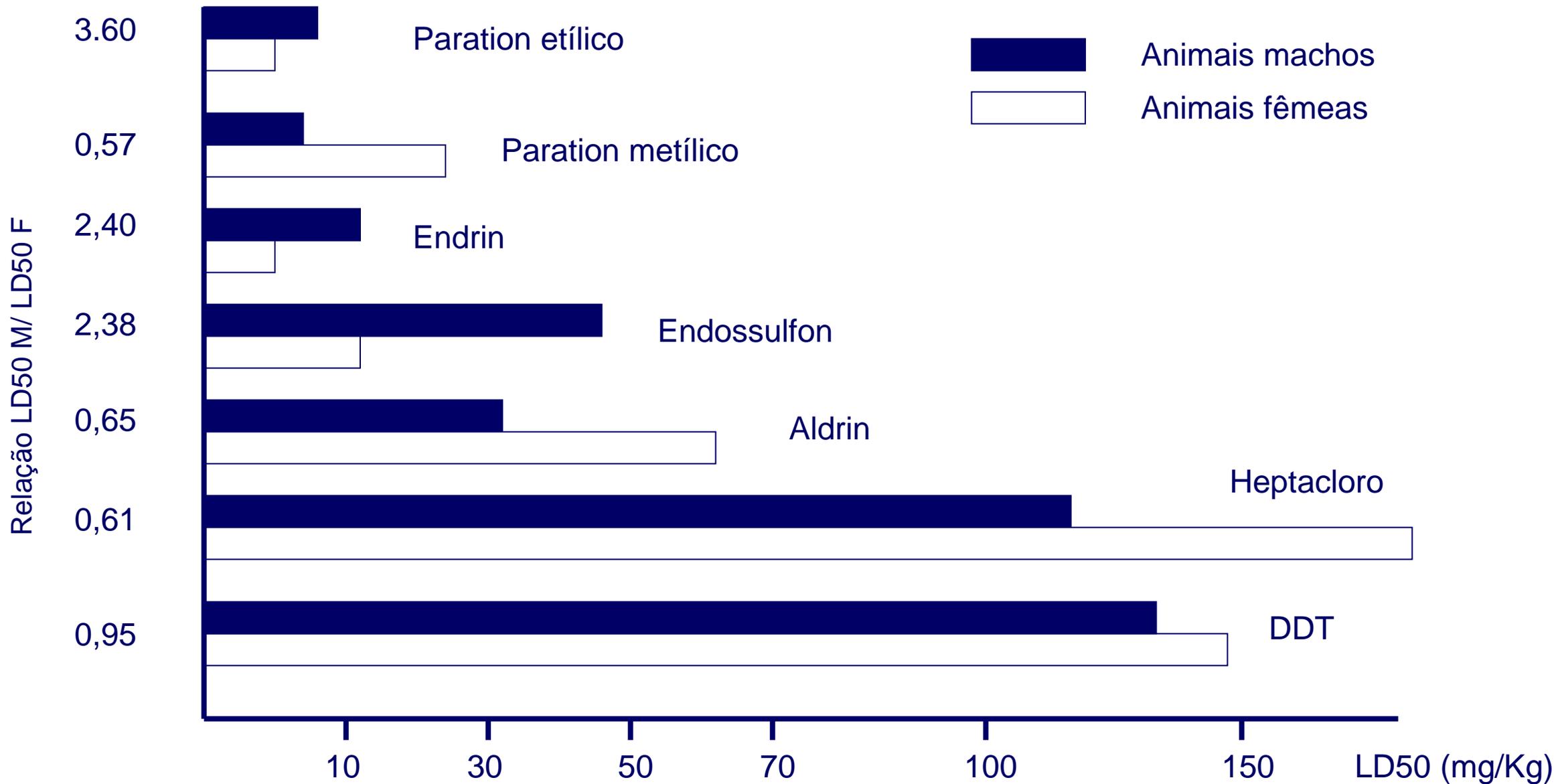
- Ex1: DL50 para 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) difere em mais de 1000 vezes entre porquinhos da Índia e hamsters.
- Ex2: Doses diárias de 10.000 ppb de aflatoxina B1 não produzem câncer hepático em camundongos, enquanto em ratos 15 ppb aumentam significativamente a incidência de câncer. Camundongos possuem alta capacidade catalítica da enzima glutatona-S-transferase que inativa a forma epóxido da aflatoxina.

# VARIAÇÃO NA RESPOSTA TÓXICA ENTRE ESPÉCIES

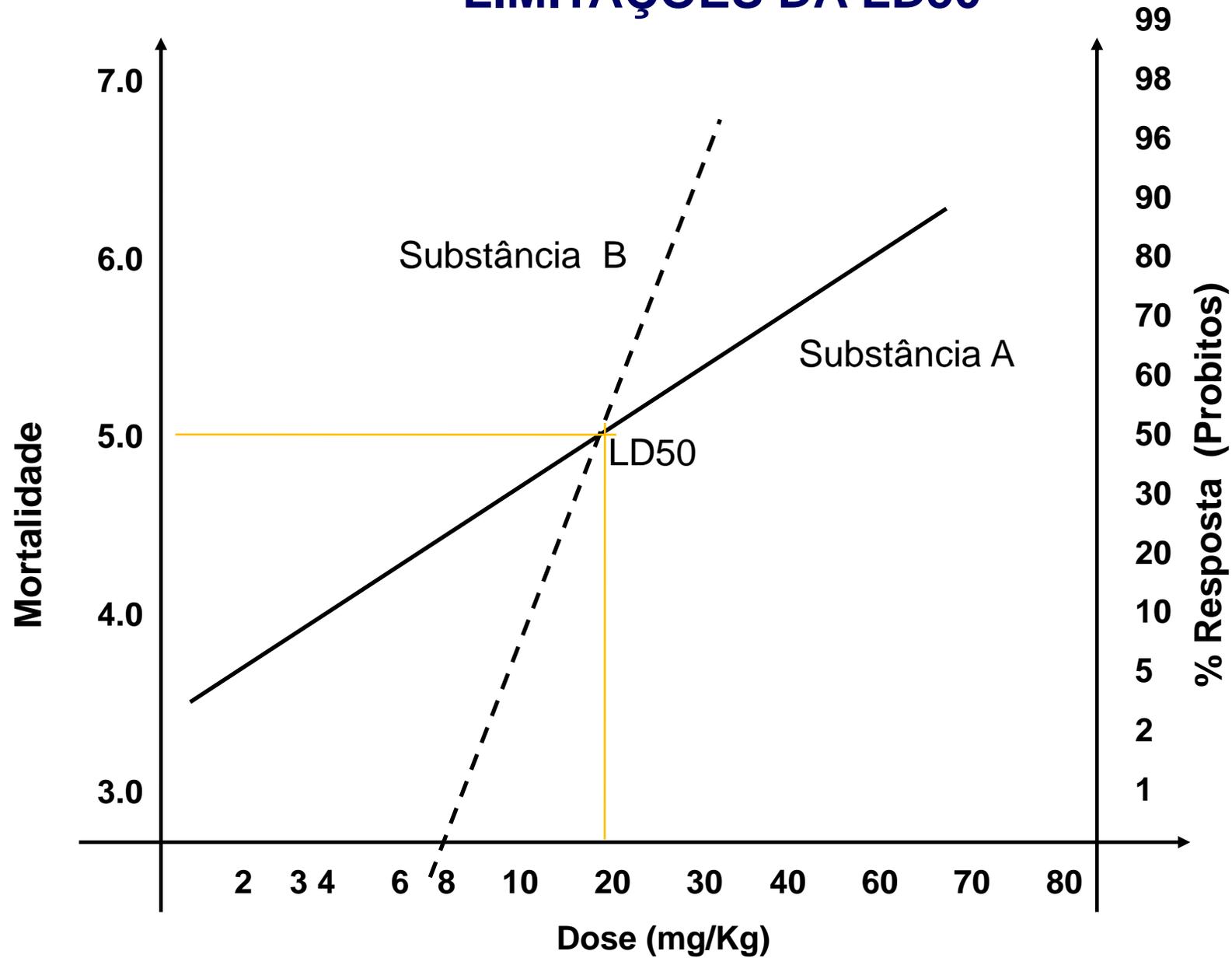
**Toxicidade aguda oral do carbaril (inseticida carbamato) em diferentes animais**

<b>Animais</b>	<b>LD<sub>50</sub> (mg/Kg)</b>
Cobaias	280
Camundongos	360-590
Rato	540-720
Coelhos	710

# VARIAÇÃO NA RESPOSTA TÓXICA ENTRE SEXOS



# LIMITAÇÕES DA LD50



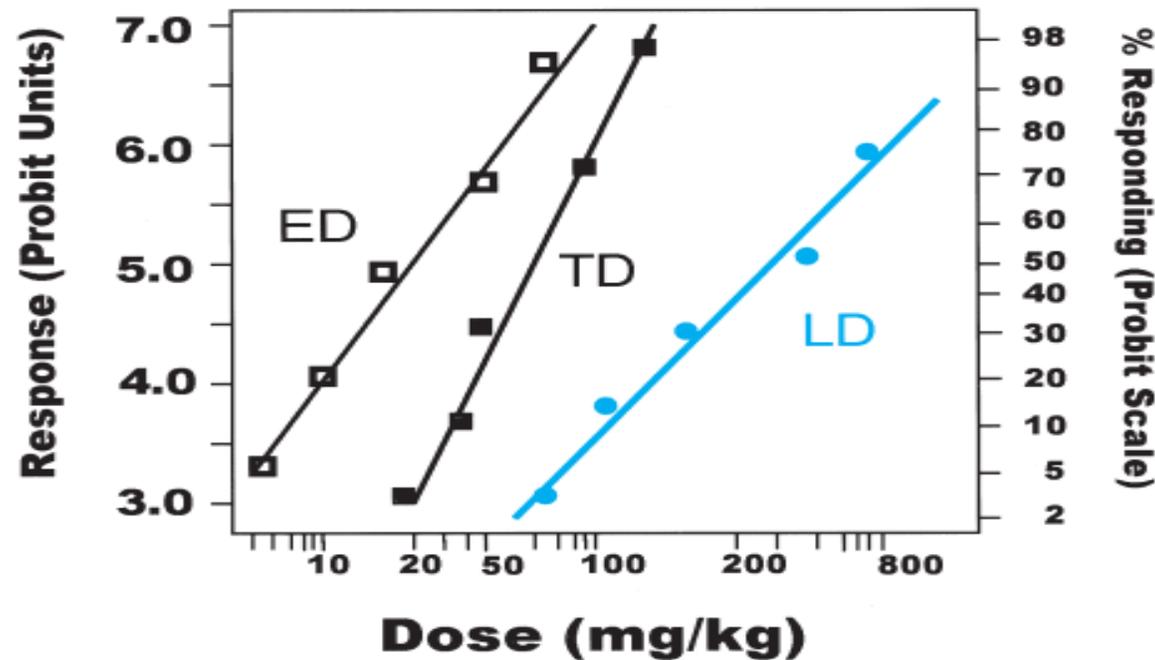
LD50 "A" e "B" =  
20 mg/kg

# TI, MOS e MOE

$$TI = \frac{TD50}{ED50}$$

$$MOS = \frac{TD1}{ED99}$$

$$MOE = \frac{TD10 \text{ ou NOAEL}}{\text{'dose de exposição'}}$$



ED = dose eficaz (terapêutica)  
TD = dose tóxica  
LD = dose letal  
TI = índice terapêutico  
MOS = margem de segurança.  
MOE = margem de exposição

MOE. Ex. Se a exposição estimada de um praguicida em humanos for de 0,001 mg/Kg/dia e a TD10 = 1mg/Kg/dia, a MOE seria 1000.

# TESTE DE IRRITAÇÃO DA PELE E OLHOS

- Realizada no caso de cosméticos ou exposições acidentais.  
Animal de eleição: coelho (pele e olhos) e a cobaia (pele).

Parâmetros avaliados (teste Draize):

- Pele: eritema, escara, edema e corrosão.
- Olhos: alterações na conjuntiva, córnea, íris e cristalino



Alternativamente modelos *in vitro* tem sido desenvolvidos, incluindo modelos de cultura de queratinócitos e células epiteliais da córnea.

# ENSAIOS 'IN VITRO'

---

*Original Article*

## **Inter-laboratory study of short time exposure (STE) test for predicting eye irritation potential of chemicals and correspondence to globally harmonized system (GHS) classification**

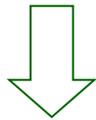
**Yutaka Takahashi<sup>1</sup>, Takumi Hayashi<sup>2</sup>, Shinichi Watanabe<sup>3</sup>, Kazuhiko Hayashi<sup>1</sup>, Mirei Koike<sup>1</sup>, Noriko Aisawa<sup>3</sup>, Shinya Ebata<sup>3</sup>, Hitoshi Sakaguchi<sup>1</sup>, Tsuneaki Nakamura<sup>3</sup>, Hirofumi Kuwahara<sup>1</sup> and Naohiro Nishiyama<sup>2</sup>**

- Teste interlaboratorial (3 laboratórios) e 44 substâncias:
  - Ensaio com **culturas de células** de olho de coelho x teste de Draize (irritação de olhos).
  - 90,9% de correlação entre os ensaios

# TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

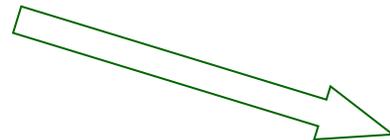
Envolve três fases distintas:

## 1) DESEMPENHO REPRODUTIVO E FERTILIDADE



-Sacrifício da metade dos animais para a constatação de anormalidades uterinas.

- animais machos e fêmeas tratados num período de até 60 dias antes do acasalamento.
- depois: fêmeas durante a gestação e lactação



-Número, sexo, peso e anormalidades externas dos filhotes. Sobrevida da mãe e peso da mãe e filhotes durante a amamentação. Sacrifício da prole: constatação de anormalidades viscerais.

# TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

## 2) POTENCIAL DE INTERFERÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL



-Administração do agente em fêmeas durante o período da organogênese.

-No final da gestação, as fêmeas são sacrificadas e os fetos retirados. São observados: sexo, peso, ocorrência de mortalidade precoce ou tardia de embriões e fetos. Exame interno: microdissecção de órgãos.

# TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

## 3) TOXICIDADE PERI E PÓS-NATAL:



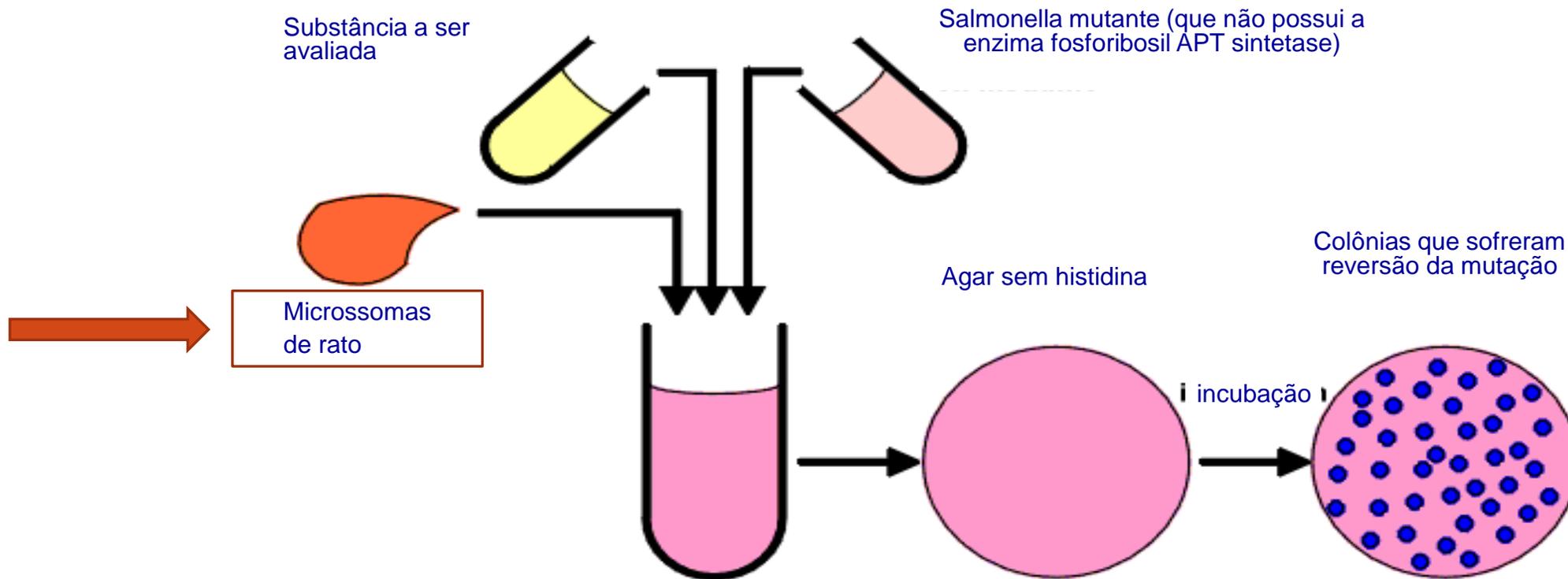
A administração do agente tóxico é feita durante o período que compreende o último terço da gestação até o desmame.

-São avaliados o desenvolvimento somático, neuromotor, sensorial e comportamental da prole.

# MUTAGENICIDADE

“*In vitro*” - São rápidos, sensíveis, de baixo custo, reprodutíveis e recomendados por entidades governamentais e órgãos de pesquisa de diversos países.

## -Teste de Ames



# MUTAGENICIDADE

## “In vivo”

Animais transgênicos foram desenvolvidos para possibilitar a avaliação *in vivo* da mutagenicidade de compostos.

-Por ex. duas linhagens comercialmente disponíveis: “Mutamouse” e “BigBlue” contém *operon lac* de E.coli que foi inserido no DNA dos animais, que pode ser recuperado para posterior análise.



# OUTROS MODELOS ANIMAIS



- Utilização do “zebra fish” para ensaios de novos compostos:
  - mais rápido,
  - mais barato,
  - maior capacidade de seleção de moléculas para as etapas subsequentes dos ensaios de toxicidade.

OPEN ACCESS Freely available online

 PLOS ONE

## Seizures Induced by Pentylenetetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization

Ben Hur M. Mussulini<sup>1\*</sup>, Carlos E. Leite<sup>2</sup>, Kamila C. Zenki<sup>1</sup>, Luana Moro<sup>1</sup>, Suelen Baggio<sup>1</sup>, Eduardo P. Rico<sup>1</sup>, Denis B. Rosemberg<sup>1</sup>, Renato D. Dias<sup>1</sup>, Tadeu M. Souza<sup>1</sup>, Maria E. Calcagnotto<sup>1</sup>, Maria M. Campos<sup>2</sup>, Ana M. Battastini<sup>1</sup>, Diogo L. de Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, <sup>2</sup>Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “IN SILICO”

Programas de computador - prever a toxicidade de compostos, através de modelos com uma série de variáveis.

The screenshot displays the Nexus software interface. On the left, a chemical structure of a query compound is shown, with a red box labeled "Query compound" pointing to it. The structure is a benzene ring attached to a chain containing an alpha,beta-unsaturated aldehyde group. Below the structure, a red box labeled "Toxicophore" points to the unsaturated part of the chain. On the right, the "Alert Details" panel shows the alert "479: alpha,beta-Unsaturated aldehyde or precursor". Below this, the "Comments" section contains text describing the skin sensitization mechanism. At the bottom, the "References" section lists two publications. A red box labeled "Predicted toxicity" points to the "Endpoints" section, which displays a table of predicted toxicity results for various compounds.

ID	Title	Aut...	Source	Year	Supplemental
483	Comparison of the local lymph-n	Basket	Food and Chemical Toxicolog	1992	DOI: 10.1016/0278-501
488	Multivariate QSAR analysis of a sk	Cronin	SAR and QSAR in Environmen	1994	Note: dataset available

diacetoxy-2-methyl-prop	alpha-methylcinnamic	(E,E)-2,4-heptadienal	trans-2-hexenal diethyl

# REFERÊNCIAS

KLASSEN, C.D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic Science of poisons, 9th, Mc Graw Hill, New York, 2019.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia, 5ed., Atheneu: São Paulo, 2021.