

 **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).



<https://www.acs.org/content/acs/en/presroom/newsreleases/2009/september/50-million-unique-chemical-substance-recorded-in-cas-registry.html>

"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.

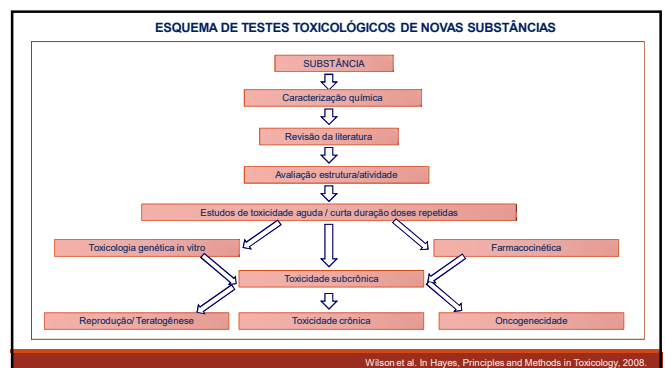
Dados toxicológicos:

- ☐ Experimentação em animais de laboratório;
- ☐ Ensaio com microorganismos;
- ☐ Estudos epidemiológicos;
- ☐ Estudos ecotoxicológicos;
- ☐ Estudos preditivos 'in silico'.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A lista de estudos pode variar de país para país, mas basicamente inclui os seguintes tópicos:

- ☐ Informações preliminares,
- ☐ Toxicidade aguda,
- ☐ Toxicidade sub-crônica,
- ☐ Toxicidade crônica,
- ☐ Mutagênese e Carcinogênese
- ☐ Reprodução e Teratogênese,
- ☐ Toxicocinética,
- ☐ Efeitos sobre a pele e olhos,
- ☐ Sensibilização cutânea,
- ☐ Ecotoxicidade



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	●

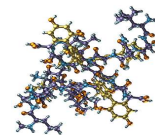


<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>

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:

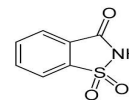
- Os efeitos produzidos por uma substância em animais de laboratório, quando devidamente quantificados, são aplicáveis em humanos.



- 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

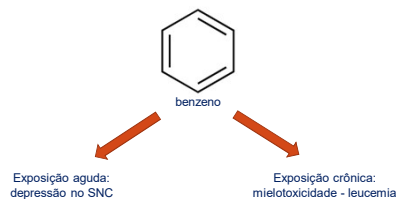
DURAÇÃO E FREQUÊNCIA DE EXPOSIÇÃO

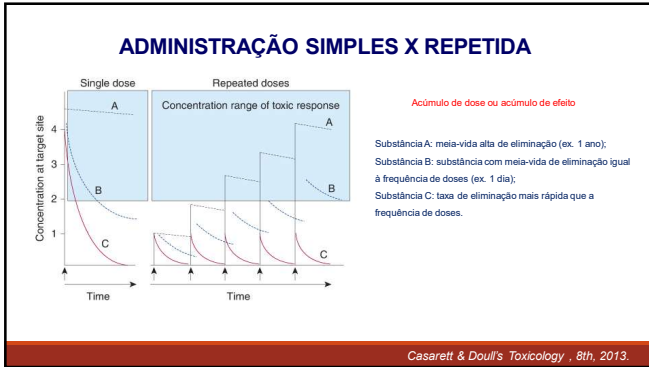
- Exposição aguda: até 24 horas (geralmente até 4 horas)
- Exposição subaguda: exposições repetidas até 1 mês
- Exposição subcrônica: de 1 a 3 meses
- Exposição crônica: mais de 3 meses.



EXPOSIÇÃO AGUDA X CRÔNICA

Exemplo:

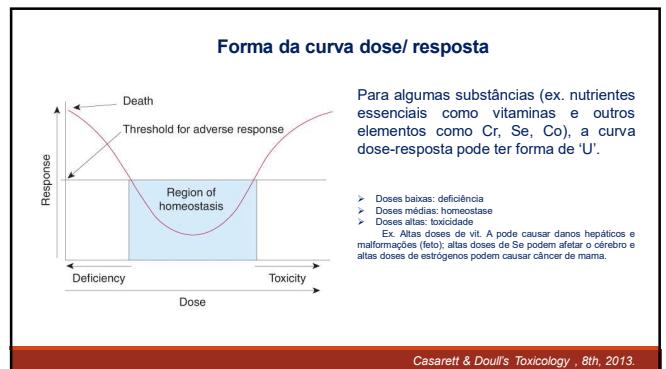
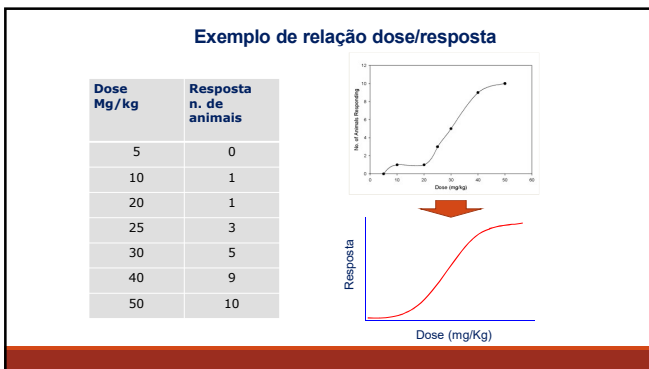
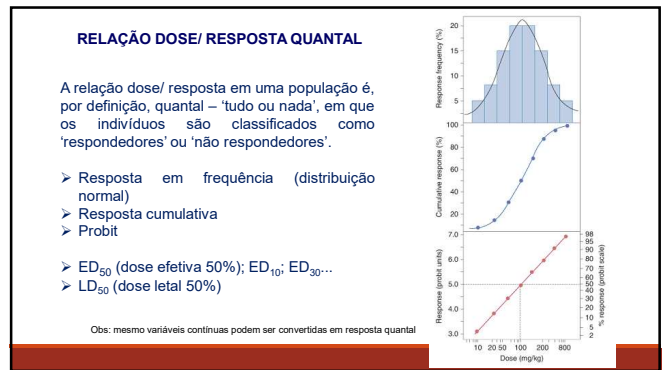
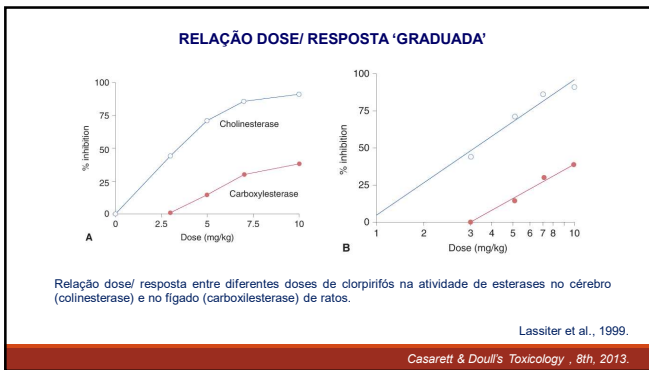


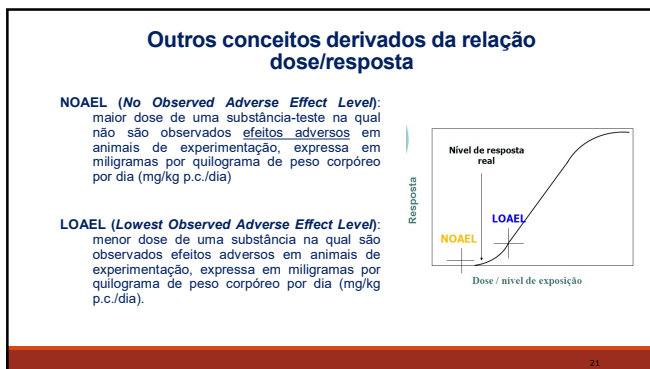
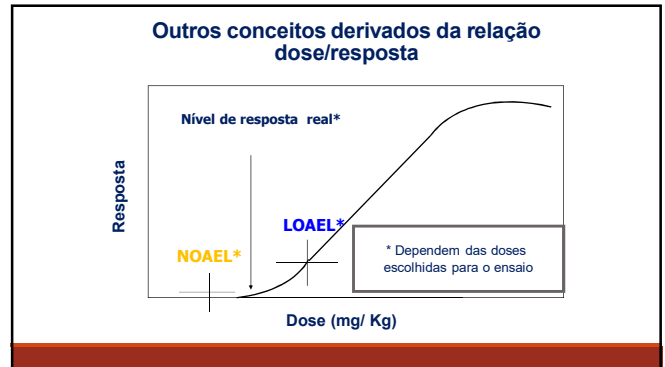
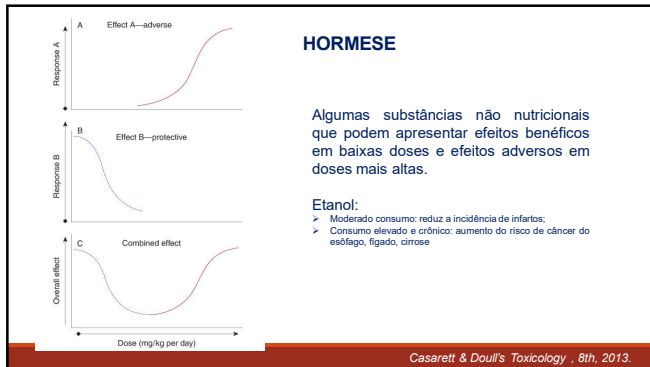


RELAÇÃO DOSE/ RESPOSTA

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.



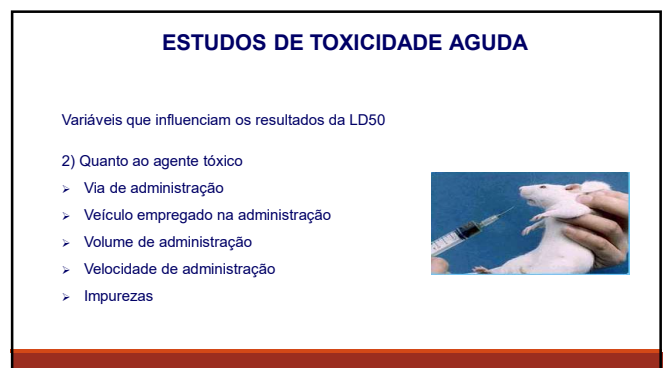
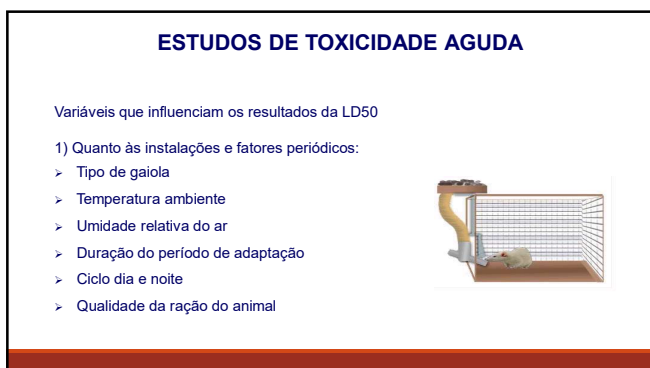


LD₅₀ de algumas substâncias:

Substância	LD ₅₀ (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 botulinina	0,00001

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

Toxicology: a case oriented approach, 2002.



VIAS DE ABSORÇÃO IMPORTANTES NA TOXICOLOGIA

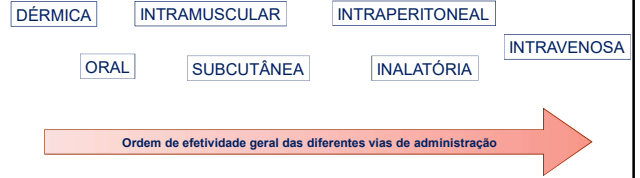
Oral - medicamentos, alimentos, fármacos ou drogas de abuso; poluentes da atmosfera (ambiental, ocupacional).

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

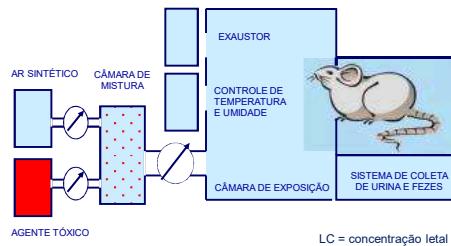
Dérmica – agentes ocupacionais, poluentes, medicamentos, agentes irritantes.

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

ESTUDOS DE ABSORÇÃO: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



TOXICIDADE AGUDA PELA VIA RESPIRATÓRIA (LC50)



ESTUDOS DE ABSORÇÃO: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Importância: exemplos

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

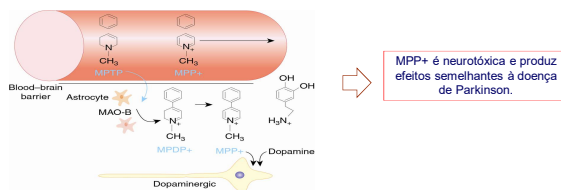
- Se a dose tóxica após administração oral ou dérmica for semelhante à intravenosa, pressupõe-se que o agente tóxico é totalmente e rapidamente absorvido.
- Por outro lado, se a dose administrada pela via dérmica for muito maior que a via oral, significa que a pele representa barreira efetiva para este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

2) Se um agente age no SNC, mas é eficientemente detoxificado 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-tetrahidropiridina (MPTP), subproduto da síntese de desmetilprodina (opioide).

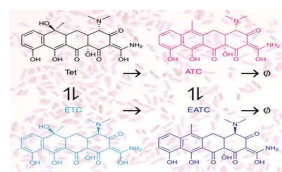


Casarett & Doull's Toxicology, 8th, 2013.

PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

➢ Fármacos também podem produzir produtos de degradação tóxicos.

Ex: tetraciclina degrada à anidrotetraciclina (ATC) e epianidrotetraciclina (EATC).



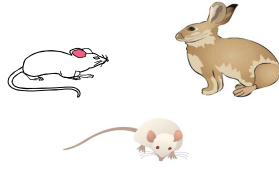
Síndrome de Fanconi, caracterizada por tubulopatia renal proximal: distúrbio na reabsorção de glicose, a.a., fosfato, bicarbonato e potássio.

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 produz câncer hepático em camundongos, enquanto em ratos 15 ppb aumenta 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

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

VARIAÇÃO NA RESPOSTA TÓXICA ENTRE SEXOS

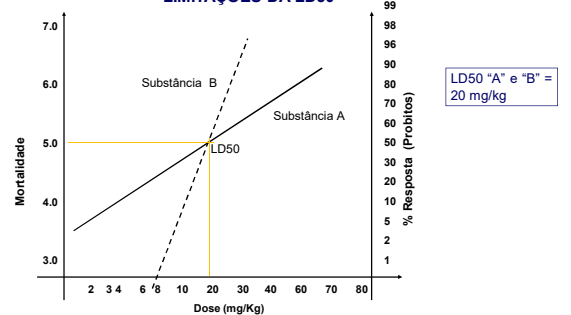


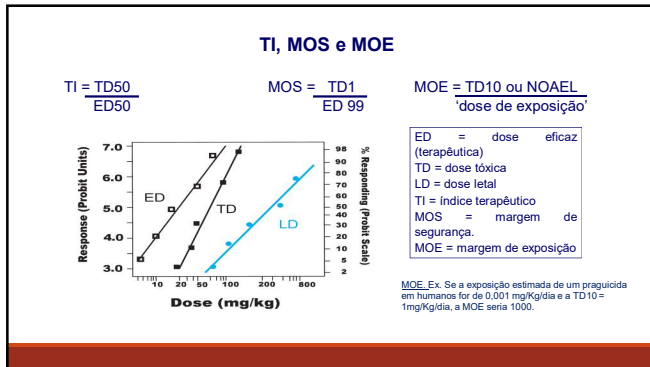
ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA

➢ LD₅₀ E OUTROS EFEITOS TÓXICOS AGUDOS:

- Devem ser determinados após 1 ou mais vias de administração (1 oral e outra via em que humanos tendem a serem expostos);
- Uma ou mais espécies (geralmente ratos e camundongos);
- Estudos realizados em animais adultos machos e fêmeas.

LIMITAÇÕES DA LD₅₀






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'

The Journal of Toxicological Sciences (J. Toxicol. Sci.)
 Vol.34, No.6, 611-626, 2009

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 Takahashi¹, Takumi Hayashi², Shinichi Watanabe³, Kazuhiko Hayashi¹, Mirei Koike¹, Noriko Aisawa⁴, Shinya Ebata⁵, Hiroshi Sakauchi¹, Tsuneaki Nakamura⁶, Hirofumi Kuwahara⁷ and Naohiro Nishiyama⁸

- 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

Takahashi et al., J Toxicol Sci., v.34, 2009.

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA


Informações sobre a capacidade de uma substância em induzir reações de sensibilização cutânea são necessárias quando houver possibilidade de contatos repetidos com a pele.

Animais: coelhos ou cobaias.


Tratamento:
 -Doses repetidas por período de uma a duas semanas.
 Após 3 semanas da última exposição, os animais são submetidos a uma dose não irritante da substância e o aparecimento de eritema é monitorado.

TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

Envolve três fases distintas:
 1) DESEMPENHO REPRODUTIVO E FERTILIDADE



-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.

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

TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

2) POTENCIAL DE INTERFERÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL:
 Administração do agente durante o período da organogênese (feito em duas espécies, sendo uma não-roedora):

Animal	Gestação(dias)	Organogênese (dias)
Rato	22	6-15
Camundongo	20	5-14
Coelho	33	6-18
Hamster	15	8-12

Três doses são administradas:
 □ Menor dose: considerada de exposição ao homem ou dose terapêutica (medicamento)
 □ Maior dose: estabelecida em função da toxicidade do composto em animais fêmeas.
 □ Dose intermediária.

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

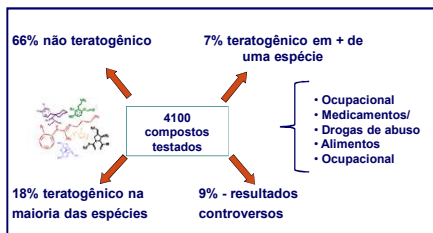
3) TOXICIDADE PERI E PÓS-NATAL:



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.

AGENTES QUÍMICOS COM POTENCIAL TERATOGÊNICO



Schardein and Macina; *Human Developmental Toxicants: Aspects of Toxicology and Chemistry*, Taylor and Francis, 2007.

DADOS EM HUMANOS

> Por outro lado, cerca de 60 compostos mostraram ser teratogênicos em humanos:

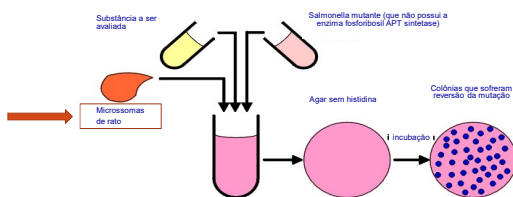
• Aminoglicosídeos	• Cloranbucil	• Etanol	• Misoprostol
• Inibidores da ECA	• Cocaína	• Fluconazol	• PCB
• Hormônios androgênicos	• Cumarinas	• Metotrexato	• Quinina
• Anticonvulsivantes	• Ciclofosfamida	• Chumbo	• Talidomida
• Bussufano	• DES	• Lítio	• Tabaco
• Monóxido de carbono	• Ergotamina	• Metil-mercúrio	• Vitamina A

Schardein and Macina; *Human Developmental Toxicants: Aspects of Toxicology and Chemistry*, Taylor and Francis, 2007.

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



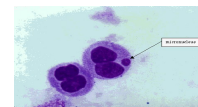
MUTAGENICIDADE

"*In vivo*"

•Teste do micronúcleo

Promove a detecção de substâncias mutagênicas clastogênicas (ruptura dos cromossomos com recombinação entre eles) ou interferentes na formação do fuso mitótico.

Os micronúcleos resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos, sendo facilmente reconhecidos no citoplasma.



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" contêm *operon lac* de *E.coli* que foi inserido no DNA dos animais, que pode ser recuperado para posterior análise.



Brusick, *Genetic Toxicology*, 2001.

ESTUDOS DE CARCINOGENESE

A carcinogênese é um processo anormal, não-controlado, de diferenciação e proliferação celular, inicialmente localizado mas que pode ser disseminado pelo organismo, provocando a sua morte.

-O câncer só pode ser evidenciado em organismos superiores,
-Estudos devem ser realizados em duas espécies de animais (ratos e camundongos). Duração: 100-130 semanas.

Todos os animais são submetidos à necrópsia completa: análise macroscópica, fragmentos representativos de lesões visíveis e análise histológica de órgãos.

ESTUDOS DE CARCINOGENESE

Testes de carcinogênese devem ser realizados principalmente nos casos em que ocorra exposição humana a longo prazo.

Limitação:

"toda substância que apresenta efeito carcinogênico em animais também apresentará em humanos" - nem sempre é verdadeira

- Variação deve estar relacionada na diferença nos processos de biotransformação de pró-carcinógenos e carcinógenos definitivos.

ESTUDOS DE ECOTOXICIDADE

Ecotoxicologia: estudo dos efeitos tóxicos provocados pelas substâncias químicas sobre os constituintes dos ecossistemas, animais, vegetais e microorganismos, num contexto integrado.

Fatores a serem considerados:

- Químicos (estados de oxidação, interação com outros materiais, etc)
- Biodegradação
- Testes de toxicidade aguda (microorganismos, plantas, peixes, mamíferos)
- Desaparecimento da atmosfera
- Biomagnificação

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



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

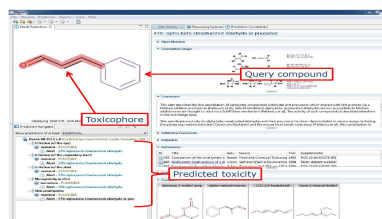
Ben Hur M. Mussulini^{1*}, Carlos E. Leite², Kamila C. Zenki¹, Luana Moro¹, Suelen Baggio¹, Eduardo P. Rico¹, Denis B. Rosenberg¹, Renato D. Dias¹, Tadeu M. Souza¹, Maria E. Calcagnotto¹, Maria M. Campos¹, Ana M. Sattestini¹, Diego L. de Oliveira¹

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

Mussulini et al., *Plos One*, v.8, 2013.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE "IN SILICO"

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



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE "IN SILICO"

TABLE 1

List of public data sources as useful training sets for predictive chemistry models

Database	Brief description	Refs
ACToR – Aggregated Computational Toxicology Resource	ACToR (Aggregated Computational Toxicology Resource) is a collection of databases collated or developed by the US EPA National Center for Computational Toxicology (NCCCT). Data includes chemical structure, physico-chemical values, <i>in vitro</i> assay data, expo	ACToR: http://actor.epa.gov/actor/actor_help_20080903.htm
CCRS	Chemical Carcinogenics Research Information System – carcinogenicity, mutagenicity, tumor promotion, and tumor inhibition data provided by the National Cancer Institute (NCI)	U.S. National Library of Medicine: http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/ccrifs.html
CHEMBL	Contains calculated properties (e.g. logP, molecular weight, Lipinski parameters, among others) and abstracted bioactivities (e.g. binding constants, pharmacology and ADMET data)	CHEMBL: https://www.ebi.ac.uk/chembl/
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	Find associations between gene/proteins, environmental chemicals and toxicology	Comparative Toxicogenomics Database: http://ctd.mdibl.org/
CPDB (The Carcinogenic Potency Database)	Provides a broad perspective on possible cancer hazards from human exposures to chemicals that cause cancer in high dose rodent cancer tests	The Carcinogenic Potency Project: http://potency.berkeley.edu/
DART	Developmental and Reproductive Toxicology and Environmental Teratology Information Center – current and older literature on developmental and reproductive toxicology	U.S. National Library of Medicine: http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/dartls.html
NTP (National Toxicology Program)	It contains toxicity studies from shorter duration tests and from genetic toxicity studies, which includes both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> tests. It also contains the immunotoxicity, developmental toxicity and reproductive toxicity studies	National Toxicology Program: http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/
RepDOSE	Repeat dose study data for dog, mouse and rat. Shows effects of chemicals on target organs. Studies are rated by reliability	RepDOSE: http://www.fraunhofer-repdose.de/
ToxRefDB	ToxRefDB (Toxicity Reference Database) captures thousands of <i>in vivo</i> animal toxicity studies on hundreds of chemicals	EPA: http://www.epa.gov/mccr/toxrefdb/

Modi et al. *Drug Discovery Today*, v. 17, 2012.

REFERÊNCIAS

KLASSEN, C.D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic Science of poisons, 8th, Mc Graw Hill, New York, 2013.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia, 4ed., Atheneu: São Paulo, 2014.