

Modelagem *in chemico*: as bases mecanísticas entre a reatividade e a toxicidade

Talita Chinellato dos Santos

Farmacêutica formada pela Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Experiência em indústria farmacêutica na área de controle de qualidade microbiológico, desenvolvimento analítico e equivalência farmacêutica. Elaboração de projetos de pesquisa na área de toxicologia social. Experiência na classificação de perigo de produtos químicos (sistemas GHS, Comunidade Européia, Diagrama de Hommel, transporte, etc) e elaboração de documentos de Segurança (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos -FISPQ, Ficha de Emergência, e rótulo). E-mail: t.chinellato@intertox.com.br

Resumo

A ausência de informações sobre as substâncias químicas quanto ao potencial de toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente vem trazendo preocupações ao longo dos anos. A metodologia *in chemico*, apesar de abordada mais profundamente nos últimos cinco anos, é conhecida há muito tempo. Esses modelos possibilitam a interação com outras técnicas como *in silico* e *in vitro* e assim a criação de modelos alternativos que possam minimizar a experimentação animal. Vem sendo discutida a aplicação de modelos *in chemico* para a predição de *endpoints* de sensibilização, toxicidade aquática, hepatotoxicidade e carcinogenicidade, já que a toxicidade de uma substância química pode estar relacionada com a sua reatividade. A preocupação quanto ao aumento do uso de animais em experimentações de avaliação de toxicidade devido às ações regulatórias como REACH, e também, a questão da proibição de testes com animais em alguns países para determinados fins; tornaram evidente a

necessidade do desenvolvimento e validação de métodos alternativos, bem como a atualização por parte de agências regulatórias.

Palavras-chave: *In chemico*. Avaliação da toxicidade. Métodos alternativos.

Abstract

The absence of information on chemicals toxicity potential to human health and the environment has brought concerns over the years. The *in chemico* methodology, although further discussed in the last five years, is known for a long time. These models allow interaction with other techniques such as *in silico* and *in vitro* and thus the creation of alternative models that minimize animal testing. The applications of *in chemico* models have been discussed for the prediction of endpoints such as sensitization, aquatic toxicity, hepatotoxicity and carcinogenicity, since the chemical toxicity may be related to their reactivity. Concerns about the increasing of animal use in experiments of toxicity assessment due to regulatory actions as REACH, and also the ban on animal testing for certain purposes in some countries, have revealed the necessity of development and validation of alternative methods, as well as the update from part of regulatory agencies.

Keywords: *In chemico*. Toxicity assessment. Alternative methods.

INTRODUÇÃO

A relação entre a capacidade de uma molécula reagir quimicamente e suas propriedades toxicológicas vem sendo descrita desde 1930 (Landsteiner e Jacobs, 1936). Essa relação, amplamente discutida nos últimos anos, originou a metodologia *in chemico*, que utiliza reações orgânicas simples relacionadas com dados já presentes na literatura para estabelecer a relação entre a reatividade de uma molécula e o efeito tóxico, dando suporte à avaliação de toxicidade das

substâncias. A implementação de ações regulatórias com objetivo de promover a segurança química, a exemplo do REACH (*Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of Chemicals*), tornou necessária a avaliação das propriedades físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas das substâncias. Estima-se que o número de animais utilizados em pesquisas para a avaliação da toxicidade à saúde e ao meio ambiente tenha um aumento significativo, mesmo que a autorização do uso de animais aconteça somente quanto necessário, seguindo os princípios dos 3Rs (*replacement, refinement and reduction*) (NCR, 2009). A legislação europeia através da Diretiva de Cosméticos proíbe os testes de avaliação de toxicidade que utilizem modelos animais nos produtos cosméticos acabados, bem como seus ingredientes separadamente. A partir de 2013 também haverá a proibição da comercialização na Europa de produtos cosméticos que tenham sido testados em animais (União Europeia, 1976).

A necessidade de disponibilizar informações toxicológicas sobre as substâncias químicas sem aumentar o número de animais utilizados e a proibição dos testes animais em cosméticos, evidencia a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos confiáveis que viabilizem a avaliação de toxicidade de substâncias químicas. O ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) visa informar, aumentar a aceitação e validar métodos alternativos nos preceitos dos 3Rs (Schaafsma *et al.*, 2009). No Brasil, recentemente foi firmado um acordo da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e a Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) para o desenvolvimento de métodos alternativos com a finalidade de reduzir a utilização de animais, que será realizado pelo Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BRACVAM). Muitas metodologias têm sido propostas como, por exemplo, os modelos *in silico*, a modelagem *in chemico* e os testes *in vitro*. O presente trabalho tem como objetivo apresentar as bases mecanísticas da reatividade *in chemico*, como base para a avaliação da toxicidade de substâncias, e, as perspectivas desta abordagem para as Ciências Toxicológicas.

Metodologia *in chemico*

Uma série de efeitos toxicológicos se inicia através de eventos moleculares. A interação de uma molécula reativa com biomoléculas pode ocasionar diferentes efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente (Asturiol e Worth, 2011). Considera-se que o efeito tóxico pode acontecer através de ligações covalentes e não covalentes (Hilson e Roberts, 1992). As ligações não covalentes são aquelas produzidas por espécies como oxigênio reativo, ânions superóxidos, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, já presentes no organismo humano e que podem ocasionar a morte celular (Hilson e Roberts, 1992).

As ligações covalentes entre substâncias químicas e macromoléculas são relatadas como um dos fatores que predispõe a toxicidade a um alvo específico. Para a substância produzir um efeito tóxico ela pode reagir quimicamente e formar uma ligação covalente com uma macromolécula, tais quais peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Schultz *et al.*, 2006). Neste tipo de mecanismo de toxicidade, as ligações às biomoléculas de diferentes funcionalidades no organismo definem o *endpoint* (efeito final) produzido pela substância.

Um dos mecanismos que explicam esse efeito é que a macromolécula ao se ligar a molécula tóxica, modifica sua estrutura restando impossibilitada de exercer sua função, outro mecanismo é pela formação de imuno-complexos (Hilson e Roberts, 1992). Essas ligações não são específicas, mas podem desencadear uma série de reações no organismo, ocasionando irritação e sensibilização da pele e trato respiratório, disfunção no sistema imune, toxicidade à reprodução, mutagenicidade, carcinogenicidade, entre outros efeitos adversos (Schultz *et al.*, 2006).

Os mecanismos de ligações podem ser diversos. A substância age basicamente como um eletrófilo e se liga a um nucleófilo presente nas proteínas humanas, os aminoácidos atuam no papel desses nucleófilos. Os *endpoints* que possuem estudos relacionados à interpolação de resultados com a toxicidade

reativa são a sensibilização dérmica, sensibilização respiratória, toxicidade aquática, mutagenicidade, hepatotoxicidade (Asturiol e Worth, 2011), toxicidade aguda e carcinogenicidade (Schwöbel *et al.*, 2010). Os métodos *in chemico* são elaborados a partir de dados de estudos prévios da toxicidade das substâncias e de estudos epidemiológicos para a comparação dos resultados obtidos quimicamente e verificação da exatidão do método proposto. As informações obtidas de modelos *in chemico* comparadas com dados existentes na literatura podem ser utilizadas para desenhar modelos QSAR e de *read-across* para determinar a toxicidade dentro de uma classe química (Schultz *et al.*, 2009).

Modelos utilizando reatividade do tiol foram descritos (Asturiol e Worth, 2011), porém as moléculas de baixo peso molecular estão sendo substituídas por nucleotídeos pequenos ou grandes (com mais de um resíduo de aminoácido), pois têm melhor similaridade com proteínas, apesar de não mimetizarem a estrutura em 3D das proteínas humanas. Também podem ser utilizadas as próprias proteínas humanas, o que melhora a extrapolação dos resultados para o real (Roberts e Patlewicz, 2009). Além de aproximar a molécula reativa a uma proteína é necessário aproximar as condições da reação para as condições fisiológicas (Asturiol e Worth, 2011), assim, reações em condições extremas não devem ser consideradas, pois não irão acontecer no organismo humano.

A avaliação da toxicidade apenas pelos grupamentos presentes nas moléculas não é a maneira mais correta, pois grupos iguais não necessariamente atuam da mesma forma em uma reação química. Os domínios funcionais que definem como a molécula irá reagir, além de outras variáveis como, quantidade de substituintes, posição dos domínios, tamanho da molécula, entre outras, podem variar por diversos fatores (Asturiol e Worth, 2011).

A glutathiona (GSH), utilizada em diversos trabalhos e modelos, consiste em um tripeptídeo com um resíduo de tiol do aminoácido cisteína, e é descrita por ter grande efetividade, reatividade além de estar presente em grande concentração nas células e participar de muitos processos fisiológicos importantes (Schwöbel *et al.*, 2010). Níveis baixos de GSH têm sido relacionados com doenças como câncer,

asma, Alzheimer e Parkinson (Asturiol e Worth, 2011). Modelos *in chemico* utilizando a glutationa têm sido utilizados para a sensibilização (Aptula *et al.*, 2006), hepatotoxicidade (Bolton *et al.*, 1992) e toxicidade aquática (Roberts *et al.*, 2010). Peptídeos com mais resíduos de aminoácidos podem melhor mimetizar a reação que acontece no organismo, pois as moléculas das substâncias a serem testadas têm possibilidades diferentes de ligação com a proteína. As moléculas podem reagir com qualquer resíduo nucleofílico presente em aminoácidos e um número grande de substâncias tem mais de um domínio eletrofílico podendo gerar diversas possibilidades de reações (Aleksic *et al.*, 2009). Estudos utilizam uma variedade de peptídeos, como, por exemplo, resíduos de lisina e tirosina (Wass e Belin, 1990) ou resíduos diversos como lisina, cisteína, histidina, alanina, arginina e tirosina (Aleksic *et al.*, 2009). Todos os estudos mostram uma boa correlação entre a reatividade das substâncias e o efeito tóxico, porém mais estudos são necessários para desenvolver métodos que mimetizem outros processos que acontecem no organismo como, por exemplo, a metabolização.

O *in chemico* propõe metodologias que utilizem de moléculas simples à complexas, incluindo uma capacidade metabólica para o sistema estabelecer a extensão e o tipo de reatividade, identificação dos complexos formados e a determinação de *endpoints* através de uma determinação qualitativa (reativa, não reativa) até quantitativa (Cronin *et al.*, 2009).

Nesse âmbito entra a possibilidade de integrar as técnicas atualmente conhecidas como *in vitro*, *in chemico* e *in silico* para melhor modelar os testes de avaliação de toxicidade. É importante ressaltar que a metodologia *in chemico* não é semelhante à metodologia *in vitro*, pois não utiliza-se de materiais biológicos apesar de alguns utilizarem enzimas entre outros, a metodologia usa basicamente as reações químicas orgânicas das moléculas e os dados presentes em estudos já realizados (Cronin *et al.*, 2009).

Mecanismos de reação

O mecanismo descrito como mais importante de ligação de substâncias químicas com proteínas é a Adição de Michael, mas também são descritas as reações de Substituição nucleofílica (S_N2), Substituição nucleofílica aromática (S_NAr), Reagente de Schiff e reações de acilação (Chipinda *et al.*, 2011). Os tipos de fragmentos das moléculas definem o domínio de reação. Uma molécula pode ter mais que um domínio de reação e pode reagir tanto predominantemente por um dos mecanismos como também por mais de um mecanismo (Aptula e Roberts, 2006). É importante também identificar moléculas pró eletrofílicas, ou seja, moléculas que após um processo de metabolização ou transformação abiótica se tornam agentes eletrofílicos tornando-se reativas. Esses efeitos são muito importantes para certos *end points* como, por exemplo, a carcinogenicidade e mutagenicidade e menos relevantes no caso da sensibilidade dérmica (Aptula e Roberts, 2006).

Adição de Michael

As substâncias que reagem por esse mecanismo de reação possuem dupla ou tripla ligação e um substituinte retirante de elétrons tais como CHO, COR, CO₂R, CN, SO₂R, NO₂ e grupos heterocíclicos como 2 ou 4 piridino. Grupos doadores de elétrons afetam a reatividade da molécula, resultando em uma fraca ou não interação com proteínas. Os substituintes alfa e beta dos carbonos também modificam a reatividade da molécula, seguindo o mesmo princípio, se o substituinte doar elétrons a molécula torna-se menos reativa e se retirar elétrons a molécula torna-se mais reativa. As moléculas chamadas de pró-aceptores de Michael, quando sofrem reações, como oxidação em contato com o ar ou metabolização pelo organismo podem se tornar reativas e produzir o efeito tóxico, substâncias que conhecidamente sofrem essa transformação são as *para* e *orto* quinonas. A reação de adição de Michael é reversível, portanto o equilíbrio de reação também influencia no resultado final e no efeito causado no organismo

(Aptula e Roberts, 2006). Esse mecanismo de reação também foi utilizado para o desenvolvimento de modelos *read across* (Schultz *et al.*, 2009).



Figura 1. Mecanismo de reação de Adição de Michael, figura adaptada de Aptula e Roberts, 2006.

Substituição nucleofílica aromática - S_NAr

As moléculas reativas para esse mecanismo são anéis aromáticos com um substituinte halogênio ou pseudo- halogênio e em posição *orto* ou *para* ao halogênio deve possuir pelo menos dois substituintes retirantes de elétrons como NO₂, CN, CHO, CF₃, SOMe, SO₂Me e nitrogênio presente no ciclo (Aptula e Roberts, 2006).

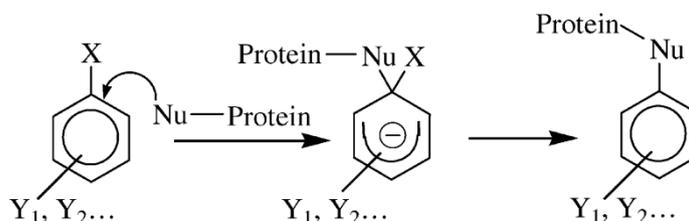


Figura 2. Mecanismo de reação de Substituição nucleofílica aromática, figura adaptada de Aptula e Roberts, 2006.

Substituição nucleofílica de segunda ordem - S_N2

As substâncias que sofrem esse tipo de reação são facilmente reconhecidas. Substâncias compostas por grupos benzílicos, alílicos e alquil primários ligados a grupos de saída como OSO₂R e OSO₂OR sendo que R pode ser tanto um grupo alifático como aromático. Quanto menor o grupamento alquila maior a rapidez da reação. Quando o grupo de saída é ligado a um grupo alquila secundário na maioria dos casos a molécula não reage de maneira suficiente para produzir o efeito no organismo, uma exceção é se carbono secundário fizer parte de um anel, nesse caso essas substâncias são sensibilizantes moderados. As moléculas são desativadas por halogênios ligados ao carbono *beta*. Anéis compostos por enxofre também sofrem esse mecanismo (Aptula e Roberts, 2006).

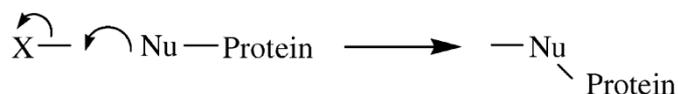


Figura 3. Mecanismo de reação de Substituição nucleofílica de segunda ordem, figura adaptada de Aptula e Roberts, 2006.

Base de Schiff

Os compostos que reagem de acordo com esse mecanismo de reação são os compostos carbonílicos como aldeídos alifáticos, α,β -dicetonas, α -cetoesteres e os sistemas hetero-insaturados como composto C-nitroso, hidrocarbonil, cianatos, isocianatos e isotiocianatos. As monocetonas simples e os aldeídos aromáticos não reagem dessa forma. Não é totalmente estabelecido que as reações no organismo sejam via formação da base de Schiff, porém há uma boa transposição de dados com a sensibilização dérmica e alguns modelos Qsar foram desenvolvidos com base nesse conceito (Aptula e Roberts, 2006).

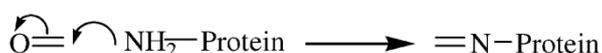


Figura 4. Mecanismo de reação de formação de base de Schiff, figura adaptada de Aptula e Roberts, 2006.

Agentes acilantes

Reagem através desse mecanismo os ésteres eletrofílicos como os carboxilatos e carbonatos, nos quais o grupo substituinte deve ser um halogênio ou um bom grupo de saída. Reagem também os anidridos cíclicos e não cíclicos, o sulfonyl, fosforil e tioacil. As substâncias que reagem por esse mecanismo geralmente são eletrófilos fortes (Aptula e Roberts, 2006).

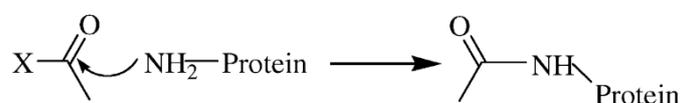


Figura 5. Mecanismo de reação de agentes acilantes, figura adaptada de Aptula e Roberts, 2006.

Sensibilização

A sensibilização pode ser causada por dois tipos de moléculas, as moléculas de alto peso molecular (maior que 1000 daltons) e as moléculas de baixo peso molecular (menor que 1000 daltons) (Lalko *et al.*, 2011). As moléculas de alto peso molecular são reconhecidas pelo organismo na forma como se encontram, e assim ativam a resposta imune. Por outro lado as moléculas de baixo peso molecular se ligam direta ou indiretamente a uma proteína e são internalizadas processadas ou metabolizadas e dispostas para que o organismo as reconheça, essas são chamadas de haptenos (Chipinda *et al.*, 2011). Os mecanismos de sensibilização dérmica e respiratória apesar de ter passagens semelhantes, diferem entre si em vários aspectos.

A sensibilização dérmica tem métodos validados e um grande acervo de dados sobre os sensibilizantes, enquanto que a sensibilização respiratória tem poucos dados, em comparação à primeira. Isso se deve, provavelmente, a seu mecanismo de desencadeamento da resposta imune não ser muito bem elucidado, os dados provirem basicamente de estudos epidemiológicos em humanos e também pelas diversas formas de manifestação da reação alérgica respiratória (Hopkins *et al.*, 2005). As diferenças entre as respostas imunes desses dois tipos de sensibilização podem estar relacionadas ao fato de cada resposta estimular uma linhagem diferente de células, pois a sensibilização dérmica ativa principalmente as células Th1 e a sensibilização respiratória ativa principalmente as células Th2, ocasionando a liberação de diferentes interleucinas e fatores de ativação celular (Lalko *et al.*, 2011). A eletrofilicidade da molécula ou sua capacidade de reagir com o nucleófilo presente nas proteínas humanas apenas não distingue um sensibilizante dérmico de um sensibilizante respiratório. Os diferentes domínios de interação mostraram-se ser importantes para a distinção do efeito, e a capacidade de descobrir onde e como as moléculas interagem pode desempenhar um papel

importante na modelagem de testes *in vitro* para esses dois *endpoints* (Chipinda *et al.*, 2011).

O local da reação e a natureza do antígeno têm papel fundamental na resposta do organismo, pois influenciam diferentes respostas no organismo, porém como acontece esse efeito não é bem elucidado (Hopkins *et al.*, 2005). A sensibilização dérmica geralmente desencadeia uma reação de hipersensibilidade do tipo 1 e a sensibilização respiratória desencadeia a hipersensibilidade do tipo 2. As substâncias químicas que produzem a resposta imune do tipo 1 demonstraram ligar-se a proteínas celulares e as substâncias que produzem resposta do tipo 2 ligaram-se preferencialmente a proteínas do soro. Essas ligações preferenciais não foram relacionadas à reatividade de diferentes aminoácidos (Hopkins *et al.*, 2005). Esse conhecimento pode ser importante para a modelagem de testes *in vitro* de sensibilizantes com reatividade conhecida, podendo distingui-los de sensibilizantes dérmicos e respiratórios.

Sensibilização dérmica

A sensibilização dérmica é um dos *endpoints* de maior preocupação, pois além de ter grande importância ocupacional, não existem testes *in vitro* para a avaliação desse *endpoint*. O teste utilizado atualmente para a avaliação da sensibilização dérmica é o *Local Lymph Node Assay* (LLNA) que substituiu o teste de maximização em Porquinhos da Índia, teste mais invasivo (Asturiol e Worth, 2011). Com as premissas do REACH, de tornar acessível os dados de toxicidade à saúde humana, e a proibição do uso de animais em testes de produtos cosméticos, uma vez que a sensibilização dérmica não possui uma metodologia *in vitro*, há a necessidade do desenvolvimento de metodologias alternativas na avaliação desse *endpoint*. A sensibilização dérmica é atualmente o modelo *in chemico* mais estudado e tem várias técnicas propostas.

O mecanismo biológico da sensibilização dérmica consiste na penetração do estrato córneo pela substância, baseada, entre outros fatores, na sua lipofilicidade

expressa pelo coeficiente de partição n-octanol/água ($\log K_{ow}$), para que disponibilize essa substância na epiderme e ocorra a posterior ligação com proteínas formando um complexo imune. Esse complexo é reconhecido e processado pelas células de *Langerhans* que migram para o linfonodo e ativam os linfócitos T produzindo a reação alérgica (Chipinda *et al.*, 2011). Estudos mostram que o $\log K_{ow}$ não é fator limitante para a sensibilização dérmica, pois algumas substâncias que possuem baixo valor de $\log K_{ow}$ se mostraram sensibilizantes (Roberts e Patlewicz, 2009). Concluiu-se que além dos processos biológicos para ocorrer a sensibilização dérmica, a ligação covalente às proteínas é um fator importante uma vez que substâncias que não são capazes de reagir quimicamente com proteínas não produzem esse efeito (Roberts e Patlewicz, 2009).

A pele é a interface do organismo com o ambiente externo e por esse motivo possui formas de metabolização de moléculas para evitar a produção de um efeito tóxico, sendo que essa metabolização está dividida em fase I e fase II (Karlberg *et al.*, 2008). Na fase I, acontece a metabolização da substância pelas enzimas presentes na pele como isoenzimas do citocromo P450, desidrogenases, esterases, amidases e monooxigenases. Após esse processo a substância passa pela fase II, sofrendo metabolização por enzimas como sulfatases, glucuronidases e glutatona que tem por função aumentar a hidrofiliabilidade da molécula para que seja melhor eliminada, é o processo de desintoxicação (Pease *et al.*, 2003). Se um intermediário dessas reações não é bem metabolizado pode se ligar a ácidos nucleicos resultando, com o tempo, em carcinogênese (Pease *et al.*, 2003). As moléculas que se ligam covalentemente a essas enzimas e proteínas e impedem que a mesma exerça seu efeito causa então o efeito tóxico, nesse caso, sensibilização ou irritação cutânea.

As substâncias não sensibilizantes podem ser transformadas em sensibilizantes: são os pré-haptenos e os pró-haptenos. Os pré-haptenos são substâncias que após passarem por um processo de oxidação, por exemplo, pelo ar, tornam-se reativos e os pró-haptenos se tornam reativos após passarem por metabolização do organismo (Karlberf *et al.*, 2008). Os pró-haptenos podem ser previstos pela relação estrutura atividade, porém apenas para classes de

substâncias conhecidas. É importante o desenvolvimento de métodos que mimetizem essa metabolização. No estudo de Bergström *et al.*(2007) foi desenvolvido um coquetel de enzimas do citocromo p450 da pele, mostrando o começo do desenvolvimento de técnicas que possam prever células que atuem como pró-haptenos (Bergström *et al.*, 2007). Outras técnicas para evitar falsos negativos dos pró e pré haptenos tem sido discutidas. O sistema denominado Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), atualmente em estado de validação pelo ECVAM (Cronin *et al.*, 2009), utiliza 2 tipos de peroxidases e o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS) mostrou ser outro início de desenvolvimento de técnicas *in vitro* promissoras (Gerberick *et al.*, 2009).

Os mecanismos de reação química propostos para a sensibilização dérmica são: Adição de Michael (acceptores e pró-acceptores de Michael), Substituição nucleofílica (S_N1 e S_N2), Substituição nucleofílica aromática (S_NAR), Reagente de Schiff e reações de acilação (Chipinda *et al.*, 2011). Ferramentas adicionais como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas podem ser integradas aos sistemas de reações que utilizam vários resíduos de aminoácidos, possibilitando a qualificação e quantificação do efeito, distribuindo as substâncias em 3 categorias: Sensibilizantes fortes, moderados e fracos, assim como no teste de LLNA (Aleksic *et al.*, 2009).

Nos compostos aromáticos com muitos grupamentos é difícil de propor o mecanismo de reação, pois possuem vários domínios funcionais e diversas possibilidades, porém pode-se ressaltar dois mecanismos como principais: a oxidação eletrofílica e a formação de radicais livres que reagem com as proteínas como o sal de Würster (Aptula *et al.*, 2009). As moléculas que demonstram reatividade aos peptídeos como a glutatona, podem ser consideradas sensibilizantes, porém o contrário nem sempre é verdadeiro, pois moléculas que não são eletrofílicas nos ensaios podem também ser sensibilizantes (Wass e Belin, 1990). A reatividade com a glutatona e o teste de *in vitro* TETRATOX foram

associados em estudo por Aptula *et al.*, (2006), demonstrando uma alta confiabilidade na predição da sensibilização.

A dificuldade da metodologia *in chemico* é mimetizar as reações no organismo como, por exemplo, as mudanças de pH, pois o pH da pele é 5,5 e o pH fisiológico é 7,4. Essas diferenças modificam o modo como a molécula reage organicamente, modificando a reatividade do nucleófilo. Há também a dificuldade da predição de moléculas que precisam passar por reações de oxidação ou metabolização para produzir o efeito tóxico, como o caso dos pró e pré haptenos. Porém a vantagem de se realizar um ensaio *in chemico* pode ser notada, pois apesar da avaliação do grupo funcional fornecer uma boa predição de como as moléculas irão reagir, algumas moléculas com os mesmos grupos funcionais não necessariamente reagem da mesma maneira. A experimentação também minimiza a falsa predição de *outliers*.

A utilização de metodologias integradas para o desenvolvimento de um método alternativo que não utilize animais para a predição da sensibilização dérmica têm se mostrado o melhor meio de se alcançar esse objetivo (Natsch *et al.*, 2009).

Sensibilização respiratória

A sensibilização respiratória é um desafio para a avaliação de toxicidade de substâncias, pois há atualmente poucos métodos aceitos para o estudo desse *endpoint*, isso deve-se ao fato do mecanismo imunológico não ser bem elucidado, diferentemente da sensibilização dérmica. A sensibilização respiratória tem grande importância no âmbito ocupacional por sua considerável taxa de mortalidade (Kimber *et al.*, 2007). A asma ocupacional também tem sido relacionada com a reatividade funcional de grupamentos presentes nessas substâncias sensibilizantes, mostrando a associação entre a reação química e o desenvolvimento da doença, tendo isso como conceito, modelos QSAR foram desenvolvidos (Jarvis *et al.*, 2005).

A toxicidade respiratória pode ocorrer de duas formas. Uma é a ligação química covalente entre as moléculas tóxicas e as macromoléculas presentes no organismo e a outra devido a suas interações físicas (Ferguson, 1939). As interações físicas seriam interações fracas não covalentes, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, que causariam irritações no trato respiratório. E as interações químicas são as interações covalentes e irreversíveis que podem resultar nas reações de hipersensibilidade.

A resposta imune respiratória a alérgenos protéicos é baseada na produção de IgE, porém não há uma ligação clara entre essa imunoglobulina e a sensibilização por compostos químicos (Lalko *et al.*, 2011). A relação entre substâncias conhecidamente sensibilizantes respiratórios e grupamentos funcionais reativos é estabelecida em diversos estudos, mostrando que a quantidade de grupos reativos tem relação direta com a capacidade de desencadear a resposta imune, diferentemente da sensibilização dérmica que não tem relação direta à quantidade de centros reativos (Lalko *et al.*, 2011).

Genotoxicidade e Carcinogenicidade

A reatividade de um composto químico pode também levar ao desenvolvimento de carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagênese (Asturiol e Worth, 2011) por diferentes meios. A molécula se liga a proteínas do organismo e causa um dano ou efeito que leva ao desenvolvimento de câncer, ou como estudado mais recentemente, a molécula se liga ao próprio DNA da célula causando assim o efeito tóxico (Hilson e Roberts, 1992). Foi demonstrado que os compostos muito reativos formados através da metabolização ou da conjugação com a glutatona podem ligar-se a moléculas de DNA produzindo efeito genotóxico (Müller *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de câncer por substâncias através da ligação com proteínas do organismo acontece e seu mecanismo é conhecido em diversos casos. Complexos carcinogênicos de proteínas como a albumina e a hemoglobina são

utilizados como marcadores de exposição. Em fumantes o número de complexos protéicos chega a 15 incluindo 2 conhecidos como carcinogênicos (Hilson e Roberts, 1992). Estudos moleculares de dosimetria são utilizados para demonstrar a presença desses compostos em situações de desenvolvimento de câncer. Uma mesma substância pode modificar diversas proteínas do organismo e assim podendo desencadear a resposta apenas com um desses compostos formados. Para poder prever esse efeito e eliminar ao máximo o número de falsos negativos, tem-se que estudar todos os complexos possíveis de serem formados e suas possíveis vias de produzir o efeito (Liebler, 2008). A avaliação da carcinogenicidade se torna muito complexa e necessita mais estudos para o melhor entendimento da correlação entre a reatividade e o efeito.

Hepatotoxicidade

A reatividade das substâncias também tem um papel importante para a hepatotoxicidade. A metabolização pelo fígado de substâncias químicas e medicamentos pode ocasionar a formação complexos de proteínas, que podem ser responsáveis por produzir o efeito tóxico (Liebler, 2008). A importância desses complexos reativos para a produção do efeito tóxico depende da proporção na qual ele é produzido, a meia-vida do intermediário reativo e a sua habilidade em ligar-se a biomoléculas (Castell *et al.*, 1997). Um dos mecanismos conhecidos de toxicidade hepática é pela depleção de GSH nos hepatócitos (Bolton *et al.*, 1992). A forma oxidada de GSH nas células tem uma concentração máxima que não deve ser excedida, e quando esta é atingida, as células precisam eliminar a GSH oxidada, como por exemplo, nos casos em que o metabólito produzido pela metabolização do fígado é eliminado através da glutathione. Assim a célula deve produzir GSH para retomar a quantidade perdida, o que causa um grande gasto de energia podendo desestabilizar o balanço energético da célula (Castell *et al.*, 1997). A depleção de GSH da mitocôndria e a alta produção de ATP podem causar deficiências mitocondriais, outro mecanismo de toxicidade hepática (Castell *et al.*,

1997). Portanto, podemos mais uma vez relacionar a reatividade de substâncias à glutathiona como causadora de efeito tóxico.

Toxicidade Aquática

A toxicidade aquática pode ser desencadeada por diversos mecanismos, mas se inicia por uma interação química entre as substâncias e o ambiente aquático (Schultz *et al.*, 2006). A toxicidade é dependente da hidrofobicidade, da eletrofilicidade do orbital molecular e da estrutura molecular da substância (Yarbrough e Schultz, 2007) e pode ocorrer por diversos efeitos como o de narcose ou reatividade das moléculas. Em ambos os casos há a mudança covalente de nucleófilos presentes nos sistemas biológicos (Roberts *et al.*, 2007). A reatividade das substâncias com GSH foi testada e demonstrou-se uma boa correlação com a toxicidade aquática, sendo que comparando os dados com estudos já existentes, as substâncias que não produzem esse efeito mostraram ser não reativas à glutathiona (Roberts *et al.*, 2007). O principal mecanismo de reação relacionado foi o de substituição nucleofílica (SN₂), porém outros mecanismos também são descritos.

A interface *in chemico* e *in silico*

A metodologia *in chemico* já foi utilizada com diversas abordagens além de demonstrar a reatividade como fator inicial da toxicidade de substâncias químicas. Como já descrito, a metodologia *in chemico* pode ser utilizada no estudo da toxicidade de drogas como para prever o risco de medicamentos de produzir efeitos adversos no organismo, como intolerância ao álcool, formação de espécies reativas de oxigênio e interações medicamentosas ou a toxicidade de drogas ao fígado, pele e sistema hematopoiéticos e também a distinção do comportamento de drogas no organismo (Cronin *et al.*, 2009). Entendendo as interações e reações, podemos prever a toxicidade sem utilizar animais. A base da reatividade abordada nos estudos descritos é a eletrofilicidade das substâncias químicas, porém outras

formas de reatividades não devem ser descartadas como, por exemplo, nucleófilos, radicais livres e espécies reativas de oxigênio, pois causam toxicidade e podem ser modeladas (Cronin *et al.*, 2009). A relação entre a toxicidade e a reatividade quando bem estabelecida pode dar origem a modelos de toxicologia computacional, ou seja, a metodologia *in silico*.

Muitas das técnicas utilizadas na metodologia *in chemico* podem dar origem a modelos QSAR de estrutura-reatividade com a finalidade de diminuir ou evitar o uso da experimentação química, desenhar modelos para prever a toxicidade e também estudar os modelos mecanísticos trazendo mais informações dos domínios químicos (Cronin *et al.*, 2009). O conhecimento dos mecanismos de reação também pode ser utilizado para o desenvolvimento de modelos de *read-across* (Schultz *et al.*, 2009).

Considerações finais

Atualmente a preocupação com o sofrimento de animais utilizados em testes que avaliam efeitos à saúde, tem aumentado e trouxe a necessidade de minimizar ou até substituir os animais nas pesquisas. Na Europa com a instituição do REACH e a proibição de testes em animais em cosméticos, vêm sendo pesquisadas novas metodologias que poderão substituir os testes existentes.

O Brasil também tomou frente a esse problema e a ANVISA criou o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos, pioneiro na América do Sul. O primeiro passo foi dado, porém há muito a ser feito ainda em relação à diminuição da dependência da experimentação animal. A política, adotada por diversas indústrias químicas e indústrias relacionadas, do livre acesso às informações toxicológicas de substâncias em conjunto da grande quantidade de produtos exportados pelo país para a Comunidade Européia trouxe também para o Brasil a necessidade da realização de ensaios toxicológicos. Para tal, seria uma grande vantagem, o investimento nos métodos alternativos, pois além das questões éticas e morais envolvidas na experimentação animal, os testes alternativos têm menor

custo, podem oferecer resultados com menor variabilidade e em tempos mais curtos quando comparados aos testes em animais. Alguns fatores podem influenciar no desenvolvimento dos métodos, tais quais a aceitação dos critérios propostos pelas autoridades competentes e o investimento em instituições de pesquisa, como as Universidades brasileiras.

A metodologia *in chemico*, que voltou a ser estudada nos últimos anos, é descrita desde a década de 1930, demonstrando resultados muito promissores e está atualmente com um método proposto para a sensibilização dérmica em estado de validação pelo ECVAM. Além disso, os dados obtidos com esses modelos *in chemico* podem ser utilizados para o desenvolvimento de modelos QSAR em Toxicologia Computacional. A integração entre as metodologias *in silico*, *in chemico* e *in vitro* têm mostrado a produção de avaliações completas quanto aos perigos das substâncias químicas e pode trazer soluções para a substituição da experimentação animal.

REFERÊNCIAS

- ALEKSIC, M. et al. Reactivity Profiling: Covalent Modification of Single Nucleophile Peptides for Skin Sensitization Risk Assessment. **Toxicological sciences**, v. 108, n. 2, p. 401–411, 2009.
- APTULA, A. O. et al. Non-enzymatic glutathione reactivity and in vitro toxicity: A non-animal approach to skin sensitization. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 239–247, 2006.
- APTULA, A. O.; ROBERTS, D.W. Mechanistic Applicability Domains for Nonanimal-Based Prediction of Toxicological End Points: General Principles and Application to Reactive Toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1097-1105, 2006.
- APTULA, A.O.; ENOCH, S.J.; ROBERTS, D.W. Chemical Mechanisms for Skin Sensitization by Aromatic Compounds with Hydroxy and Amino Groups. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, p. 1541–1547, 2009.

ASTURIOL, D.; WORTH, A. The Use of Chemical Reactivity Assays in Toxicity Prediction. **JRC - Joint Research Centre**. European Union, 2011. (EUR 24870 EN)

BERGSTRÖM, M.A. et al. A Skin-Like Cytochrome P450 Cocktail Activates Prohaptens to Contact Allergenic Metabolites. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1145–1153, 2007.

BOLTON, J.L.; VALERIO, L.G.; THOMPSON, J.A. The Enzymatic Formation and Chemical Reactivity of Quinone Methides Correlate with Alkylphenol-Induced Toxicity in Rat Hepatocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, p. 816-822, 1992.

CASTELL, J.V. et al. *In vitro* Investigation of the Molecular Mechanisms of Hepatotoxicity. **Archives of Toxicology**, v. 19, p. 313-321, 1997.

CHIPINDA, I.; HETTICK, J.M.; SIEGEL, P.D. Haptentation: Chemical Reactivity and Protein Binding. **Journal of Allergy**, v. 2011, doi: 10.1155/2011/839682.
CRONIN, M.T.D. et al. The In Chémico–In Silico Interface: Challenges for Integrating Experimental and Computational Chemistry to Identify Toxicity. **ATLA**, v. 37, p. 513–521, 2009.

FERGUSON, J. The Use of Chemical Potentials as Indices of Toxicity. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 127, p. 387-404, 1939.

GERBERICK, G.F. et al. Investigation of Peptide Reactivity of Pro-hapten Skin Sensitizers Using a Peroxidase-Peroxide Oxidation System. **Toxicological sciences**, v. 112, n. 1, p. 164–174, 2009.

HINSON, J.A.; ROBERTS, D.W. Role of covalent and noncovalent interactions, in cell toxicity: Effects on Proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 471-510, 1992.

HOPKINS, J.E. et al. Selective Haptentation of Cellular or Extracellular Protein by Chemical Allergens: Association with Cytokine Polarization. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, p. 375-381, 2005.

SANTOS, Talita Chinellato Modelagem in chémico: as bases mecánísticas entre a reatividade e a toxicidade. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 3, p. 114-136, out. 2011.

INCQS – INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. ANVISA e INCQS: parceira contra o uso de animais. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=815:anvisa-aprova-parceria-com-incqs-para-excluir-animais-de-pesquisas&catid=42:noticias-do-site&Itemid=132>. Acesso em: 27 set. 2011.

JARVIS, J. et al. Relationship between chemical structure and the occupational asthma hazard of low molecular weight organic compounds. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 62, p. 243–250, 2005.

KARLBERG, A. et al. Allergic Contact Dermatitis - Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 53–69, 2008.

KIMBER, I. et al. Chemical Respiratory Allergy: Opportunities for Hazard Identification and Characterization. **ATLA**, v. 35, p. 243-265, 2007.

LALKO, J.F. et al. Chemical reactivity measurements: Potential for characterization of respiratory chemical allergens. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 433–445, 2011.

LANDSTEINER, K.; JACOBS, J. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. **Journal of Experimental Medicine**, v. 64, p. 625–639, 1936.

LIEBLER, D.C. Protein Damage by Reactive Electrophiles: Targets and Consequences. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 117–128, 2008.

MÜLLER, M.; BIRNER, G.; DEKANT, W. Reactivity of Haloketenes and Halothioketenes with Nucleobases: Chemical Characterization of Reaction Products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 454-463, 1998.

MURPHY, S.D. Some Concepts in Toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 32, p. 261-266, 1979.

NATSCH, A.; EMTER, R.; ELLIS, G. Filling the Concept with Data: Integrating Data from Different In Vitro and In Silico Assays on Skin Sensitizers to Explore the Battery Approach for Animal-Free Skin Sensitization Testing. **Toxicological sciences**, v. 107, n. 1, p. 106–121, 2009.

NCR - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory**. Washington: Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory, 2009.

PEASE, C.K.S.; BASKETTER, D.A.; PATLEWICZ, G.Y. Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, p. 177–183, 2003.

ROBERTS, D.W.; PATLEWICZ, G. Chemistry Based Nonanimal Predictive Modeling for Skin Sensitization. In: DEVILLERS, J. (Ed.). **Ecotoxicology Modeling**, Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approach and Perspectives 2. Springer: France, 2009.

ROBERTS, D.W. et al. Experimental Reactivity Parameters for Toxicity Modeling: Application to the Acute Aquatic Toxicity of S_N2 Electrophiles to *Tetrahymena pyriformis*. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 228–234, 2010.

SCHAAFSMA, G. et al. REACH, non-testing approaches and the urgent need for a change in mind set. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 70–80, 2009.

SCHULTZ, T.W. et al. A conceptual framework for predicting the toxicity of reactive chemicals: modeling soft electrophilicity. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 17, n. 4, p. 413–428, 2006.

SCHUTZ, T.W.; ROGERS, K.; APTULA, A.O. Read-across to rank skin sensitization potential: subcategories for the Michael acceptor domain. **Contact Dermatitis**, v. 60, p. 21–31, 2009.

SCHWÖBEL, J.A.H. et al. Prediction of Michael-Type Acceptor Reactivity toward Glutathione. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1576–1585, 2010

SANTOS, Talita Chinellato Modelagem in chemico: as bases mecánicas entre a reatividade e a toxicidade. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 3, p. 114-136, out. 2011.

UNIÃO EUROPÉIA. EUR-Lex. **Directiva da Comissão de 06 de Agosto de 2001 que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Directiva 67/548/CEE do Conselho**. Relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31967L0548:PT:HTML>>. Acesso em: 27 set. 2011.

UNIÃO EUROPÉIA. EUR-Lex. **Directiva do Conselho de 27 de Julho de 1976 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos produtos cosméticos (76/768/CEE)(JO L 262 de 27.9.1976, p. 169)**. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301:pt:PDF> Acesso em: 27 set. 2011

YARBROUGH, J.W.; SCHULTZ, T.W. Abiotic Sulfhydryl Reactivity: A Predictor of Aquatic Toxicity for Carbonyl-Containing α,β -Unsaturated Compounds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 558-562, 2007.

WASS, U., BELIN, L. An in vitro method for predicting sensitizing properties of inhaled chemicals. **Scandinavian Journal of Work Environment and Health**, v. 16, p. 208-214, 1990.