

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

DANIELA RODRIGUES TONHOLO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE MOLÉCULAS POTENCIALMENTE TERAPÊUTICAS

Belo Horizonte

2018

DANIELA RODRIGUES TONHOLO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE MOLÉCULAS POTENCIALMENTE TERAPÊUTICAS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obter grau de mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Carlos Alberto Tagliati

Belo Horizonte

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e pela consolação em momentos difíceis;

Ao meu esposo, Jônatas, pela dedicação e apoio durante toda a caminhada;

À minha família pelas palavras de ânimo quando precisei;

Ao orientados prof. Carlos Alberto Tagliati, pela coordenação do projeto;

À prof.^a Renata Barbosa Oliveira e à Iara Rinco Silva pela síntese química das substâncias testadas;

Ao Patrick e Maria Fernanda pela colaboração no teste de toxicidade aguda;

Aos colegas do laboratório de Toxicologia *in vitro* (LabTox) por toda ajuda;

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela oportunidade de realizar este projeto

RESUMO

No desenvolvimento de novos medicamentos, nove entre dez candidatos promissores que iniciam a fase clínica não receberão aprovação. Reduzir a falha de candidatos a fármacos utilizando ensaios *in vitro* pode reduzir o uso desnecessário de animais, bem como prever efeitos tóxicos em fases pré-clínicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade pelo método MTT de quatro novas substâncias nas linhagens celulares A549, H9C2, HEP-G2, LLC-PK1 e NEURO-2. Para substância que apresentou menor citotoxicidade no teste de MTT, realizou-se o teste do vermelho neutro de acordo com a OECD 129 a fim de extrapolar o resultado obtido como dose inicial para o teste de toxicidade aguda (OECD 423). A dose inicial de 300 mg/kg não promoveu efeitos tóxicos observáveis para os animais estudados. Por outro lado, a dose de 2000 mg/kg causou a morte de um animal em cada grupo, entretanto, nenhum dos grupos apresentou alterações macroscópicas na necropsia. Os resultados do presente estudo mostram limitações do teste de vermelho neutro como preditor da dose inicial para o estudo de toxicidade aguda devido a vários fatores como limitada biodisponibilidade *in vivo* e geração de metabólitos tóxicos.

Palavras-chave: Toxicologia pré-clínica. Modelos *in vivo* e *in vitro*. Citotoxicidade. OECD 129. OECD 423. Métodos alternativos.

ABSTRACT

In the development of new medicines, nine out of ten promising candidates entering the clinical phase will not receive approval. Reducing the failure of drug candidates using *in vitro* assays can reduce the unnecessary use of animals as well as predict toxic effects at preclinical stages. The objective of the present study was to evaluate MTT cytotoxicity of four new substances in the A549, H9C2, HEP-G2, LLC-PK1 and NEURO-2 cell lines. For the substance that showed the lowest cytotoxicity in the MTT test, the neutral red test according to OECD 129 was performed in order to extrapolate the result obtained as the initial dose for the acute toxicity test (OECD 423). An initial dose of 300 mg / kg did not promote observable toxic effects for the animals studied. On the other hand, the dose of 2000 mg / kg resulted in the death of one animal in each group; however, none of the groups presented macroscopic changes at necropsy. The results of the present study shows limitations of the neutral red test as a predictor of the initial dose for the acute toxicity study due to several factors such as limited *in vivo* bioavailability and generation of toxic metabolites.

Palavras-chave: Preclinical toxicology. *in vitro* and *in vitro* models. Cytotoxicity. OECD 129. OECD 423. Alternative methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos	1
Figura 2 - Principais causas do insucesso de compostos em desenvolvimento ..	3
Figura 3 - Fluxograma de ensaio para teste de toxicidade oral aguda.....	8

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
A549	<i>Human Lung Carcinoma Epithelial cell line</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
BALB 3T3	<i>Mouse Embryonic Fibroblast cell line</i>
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DL ₅₀	Dose Letal para 50% da população testada
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
H9C2	<i>Rat Myoblastic cell line</i>
HEP-G2	<i>Human Liver Hepatocellular cell line</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
LLC-PK1	<i>Porcine Kidney cell line</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>

MIC	Concentração inibitória mínima
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
nm	Nanômetros
NEURO-2A	<i>Mouse Neuroblast cell line</i>
NR	<i>Neutral Red</i>
NRC	<i>National Research Council</i>
NRU	<i>Neutral Red Uptake Assay</i>
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
VERO	<i>Monkey Kidney Epithelial cell line</i>

SUMÁRIO

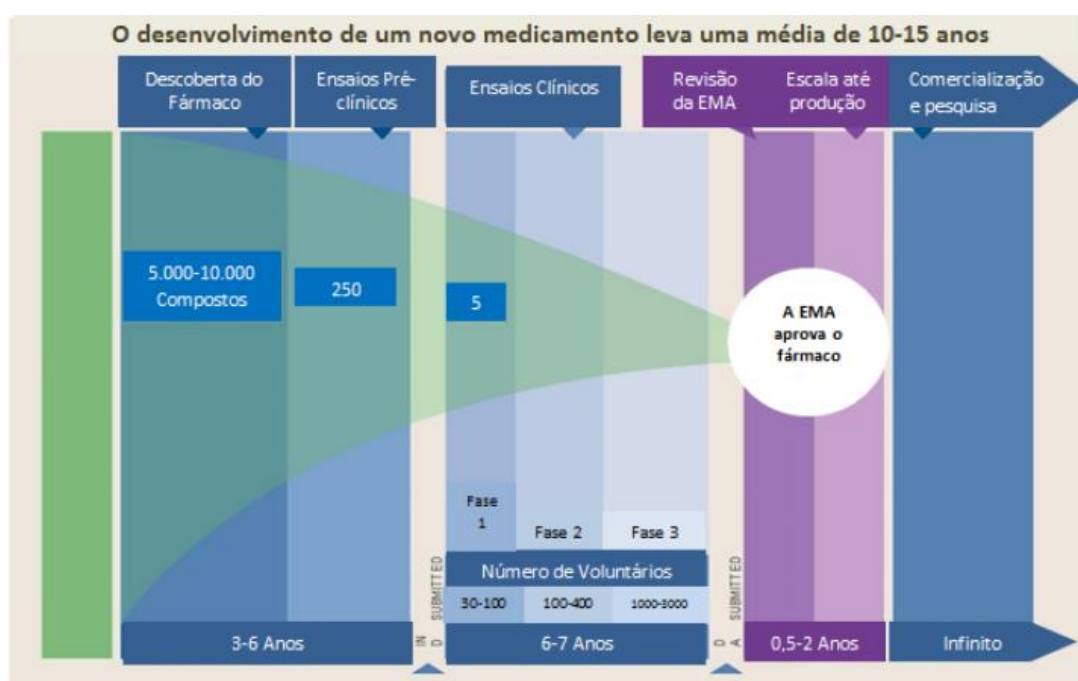
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Desenvolvimento de novos fármacos	9
1.2 Toxicologia pré-clínica	11
1.3 Ensaios de toxicidade in vitro	12
1.4 Ensaios de toxicidade in vivo	14
1.5 Aspectos regulatórios	16
1.6 Substâncias testadas	17
1.6.1 Antifúngica	17
1.6.2 Anti-tripanosomatídeas	18
1.6.3 Antioxidante	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 ARTIGO	22
3.1 NOTA EXPLICATIVA	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento de novos fármacos

O processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco é moroso, dispendioso e envolve várias etapas (Figura 1). Após a seleção das moléculas com maior potencial farmacológico, inicia-se uma das etapas mais importantes designada como etapa de ensaios toxicológicos pré-clínicos, esses permitem a determinação dos efeitos adversos e do risco da exposição ao novo fármaco para o ser humano (HORNBERG et al, 2014; LAVANDEIRA, 2014). As fases clínicas e a aprovação de medicamentos levam cerca de 10 anos, com custos que se aproximam de 2 bilhões de dólares (ABRACO, 2017; MORGAN et al, 2011), sendo que 90% dos fármacos falham após os primeiros estudos em humanos (ARROWSMITH, 2011).

Figura 1 – Pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (Legenda: EMA: European Medicines Agency – Agência Europeia de Medicamentos.



Fonte: <http://www.icontrolmyhealth.org/treatment-options/pharmaceuticals>

O processo de desenvolvimento de medicamentos envolve estudos não clínicos e clínicos e são conduzidos usando diferentes protocolos, incluindo estudos em animais, que seguem principalmente os regulamentos de boas práticas de laboratório (EMA, 2010). Durante o processo inicial de desenvolvimento pré-clínico, também conhecido

como decisão *Go/No-Go*, um candidato a medicamento deve passar por várias etapas, incluindo estudos sobre farmacocinética: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, além de estudos preliminares que visam investigar a segurança do candidato, incluindo genotoxicidade e mutagenicidade. Esses têm como objetivo investigar a segurança da molécula para obter a primeira informação sobre sua tolerabilidade em diferentes sistemas que são relevantes para novas decisões (ANDRADE *et al*, 2016). O processo de avaliação toxicológica pré-clínica gradual no desenvolvimento farmacêutico tem o principal objetivo de caracterizar potenciais efeitos adversos relacionados à dose em relação aos tecidos, órgãos e sistemas, e, quando apropriado, sua reversibilidade potencial (EMA, 2010). Dessa forma, a migração de estudos toxicológicos em fases pré-clínicas impede que os candidatos a medicamentos com risco de segurança ingressem no desenvolvimento clínico (MORGAN *et al*, 2011).

A toxicidade é a principal causa de desgaste de candidatos a drogas nas etapas pré-clínicas, representando 44,1% desse total (Figura 2), mais tarde, a eficácia em ensaios clínicos torna-se a principal causa de falhas: aproximadamente 75% na Fase 3 (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004). Para superar esses desafios, a indústria farmacêutica tem aplicado abordagens inovadoras a fim de minimizar a taxa de desgaste, interromper o desenvolvimento de candidatos a medicamentos antes de entrar em fases mais caras dos estudos clínicos e oferecer uma condução mais segura ao processo (KRAMER, SAGARTZ, MORRIS, 2007).

Figura 2 – Principais causas do insucesso de compostos em desenvolvimento.

Pesquisa de Razões para Falha de Compostos em Desenvolvimento					
Fases	Pré-clínica	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Registro
Segurança Clínica	0,5%	27,9%	13,4%	9,8%	30,0%
Eficácia	5,6%	17,5%	52,0%	72,5%	20,0%
Formulação	5,1%	5,8%	1,6%	0,0%	0,0%
Potencial de Mercado	6,2%	3,9%	7,9%	3,9%	30,0%
Farmacocinética/ Biodisponibilidade	11,8%	14,9%	2,4%	0,0%	0,0%
Estratégia	14,4%	12,3%	13,4%	5,9%	20,0%
Recursos	1,5%	1,3%	0,8%	3,9%	0,0%
Toxicologia	44,1%	10,4%	2,4%	3,9%	0,0%
Custos dos produtos	1,5%	1,3%	0,0%	0,0%	0,0%
Desconhecido	7,2%	1,3%	4,7%	0,0%	0,0%
Outros	2,1%	3,2%	1,6%	0,0%	0,0%
Número de projetos	195	154	127	51	10

Fonte: Adaptado de: SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004.

Dessa forma, a toxicologia deve ser integrada ao processo de descoberta, com o objetivo de fornecer decisões oportunas e direcionar as equipes de pesquisa a afastar-se do risco de falha na segurança (CHAPMAN et al., 2012, HORNBERG et al, 2014).

1.2 Toxicologia pré-clínica

Em 2007, o Conselho Nacional de Pesquisa (NRC) dos Estados Unidos publicou *Testando a Toxicidade no século 21: Uma visão e uma estratégia*. O relatório destacou a necessidade de tecnologias de rastreio de alto rendimento para identificar a atividade biológica induzida quimicamente em células humanas e linhagens celulares. Também destacou a importância de se desenvolver modelos preditivos da resposta biológica *in vivo*. Nos anos seguintes à publicação do relatório do NRC, houve grande discussão pela comunidade científica acompanhada de progressos significativos no desenvolvimento de ensaios e ferramentas que ajudarão a atingir os objetivos levantados pelo NRC. Isso levanta a importante questão de como os dados *in vitro* e modelos *in silico* podem ser usados para entender e prever a toxicidade *in vivo* (KNUDSEN et al., 2015; ANDERSEN, KREWSKI, 2010; STURLA et al., 2014).

O incentivo ao uso de novos métodos *in vitro* é alto e tal estratégia é reconhecida no guia da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), n. 404 (*Aguda Dermal Irritation/Corrosion*), que recomenda a realização de ensaios *in vitro* para limitar a gravidade da toxicidade para compostos que progridem para avaliação *in vivo*. Do mesmo modo, a OECD 437 foi concebida para identificar substâncias que são corrosivas oculares ou severamente irritantes para os olhos. As substâncias que são negativas neste teste seriam obrigadas a submeter-se a testes *in vivo* adicionais para permitir uma classificação precisa (CHAPMAN et al., 2012).

A avaliação da segurança de novos produtos requer a combinação de informações advindas de diversas fontes para fornecer uma correta avaliação do risco para a saúde (ICCVAM, 2006). Tudo isso é possível com testes *in vitro* e *in silico* aprimorados para selecionar e/ou dirigir o projeto de compostos visando mecanismos específicos necessários para a eficácia terapêutica, evitando os associados com toxicidade (CHAPMAN et al., 2012).

O ensaio de Ames, aberração cromossômica *in vitro*, micronúcleo *in vitro* e ensaios *in vivo* de toxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva são alguns dos testes comumente usados em toxicologia preditiva. Embora estes testes tenham evoluído e sido modificados para especificidade, sensibilidade e capacidades de alto rendimento, existem várias desvantagens inerentes que se relacionam com o poder preditivo: a relevância para a via de exposição, a falta de complexidade, os efeitos específicos do tipo de célula (ensaios *in vitro*) e diferenças específicas de espécies (roedores *versus* humanos). Todos esses fatores são limitantes da extrapolação à toxicidade humana (ZHANG, 2014).

1.3 Ensaios de toxicidade *in vitro*

Há uma grande variedade de ensaios que são usados para avaliar a toxicidade ou viabilidade celular (STONE, 2009), os testes *in vitro* oferecem vantagens, incluindo condições de teste controladas; nível elevado de padronização; redução na variabilidade entre experimentos; baixo custo nos testes; pequena quantidade de material necessário e quantidade limitada de resíduos tóxicos. Outra grande vantagem é a disponibilidade atual de uma variedade de linhagens em bancos de células, o que possibilita maior acesso e utilização de modelos *in vitro*, sendo uma alternativa para avaliações de toxicidade de muitas substâncias químicas (ARAUJO, 2014).

Um dos ensaios mais comuns é o MTT, esse determina a viabilidade celular medindo a função mitocondrial pela atividade de enzimas mitocondriais, como succinato desidrogenase (STONE, 2009; PEREZ, 2017). O mecanismo bioquímico por trás do ensaio MTT envolve a enzima oxidoreductase celular dependente de NAD(P)H que converte o MTT no composto formazano, composto insolúvel que pode ser solubilizado com dimetilsulfóxido (DMSO) (BAHUGUNA, 2017). O ensaio gera um produto colorido, que pode ser quantificado por absorvância de luz a um comprimento de onda específico. O valor de absorvância gerado é representativo do número de células e da viabilidade funcional dessas células. O ensaio pode, portanto, detectar a proliferação celular, bem como a citotoxicidade (STONE, 2009; PEREZ, 2017).

Outro ensaio conhecido por medir a viabilidade celular, é o teste de vermelho neutro, O procedimento baseia-se na capacidade de células viáveis incorporarem e ligarem o vermelho neutro (NR), um corante supravital. O NR é um corante fracamente catiônico que se difunde rapidamente através da membrana plasmática e se concentra nos lisossomas, onde se liga eletrostaticamente à matriz lisossomal aniônica. Substâncias tóxicas podem alterar a superfície celular ou a membrana lisossômica causando fragilidade lisossomal e outras alterações adversas que gradualmente se tornam irreversíveis (ICCVAM, 2006; OECD, 2010). Assim, a morte celular e/ou inibição do crescimento celular diminui a quantidade de NR retido pelas células. Células de mamíferos saudáveis em proliferação, quando adequadamente mantidas em cultura, continuamente se dividem e se multiplicam com o tempo. Dessa forma, uma substância tóxica, independentemente do local ou mecanismo de ação, irá interferir com este processo e resultar em uma redução da taxa de crescimento como refletido pelo número de células. A citotoxicidade é expressa como uma redução dependente da quantidade captada de NR após a exposição da substância às células, proporcionando assim um sinal integrado e sensível tanto da integridade celular como da inibição do crescimento. (PEREZ, 2017). Com isso, teste de vermelho neutro é realizado em um formato dose-resposta para determinar a concentração da droga que reduz a viabilidade celular em 50% em comparação com os controles (isto é, o IC₅₀). O valor IC₅₀ é usado em uma equação de regressão linear para estimar o valor da DL₅₀ oral (dose letal para 50% da população testada), que é então usado para determinar uma dose inicial para o ensaio de toxicidade oral aguda. Esse teste tem seu método padronizado pela OECD 129 (OECD, 2010; STOKES, 2008).

O conceito de usar dados de citotoxicidade *in vitro* para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda de roedores foi discutido e avaliado em um *Workshop* Internacional sobre Métodos *in vitro* para Avaliação de Toxicidade Sistêmica Aguda, convocado em 2000 (NIH, 2001). As simulações mostraram que o uso de ensaios de citotoxicidade *in vitro* para estimar uma DL₅₀ para usar como uma dose inicial poderia reduzir potencialmente o uso de animais em 25-40% (ICCVAM, 2006; STOKES, 2008; PRIETO, 2014).

1.4 Ensaios de toxicidade *in vivo*

Tradicionalmente, a avaliação da segurança de novos produtos químicos requer estudos regulatórios em animais com o fim de proteger a saúde humana e o meio ambiente. Dada a sua importância, a utilidade dos modelos animais para a previsão da segurança humana deve ser revista regularmente à medida que os avanços na compreensão científica e métodos técnicos evoluem (ARAUJO, 2014). Essa prática é essencial para garantir o uso adequado dos animais nos estudos de toxicologia, com os objetivos de não só melhorar o seu valor preditivo, mas também reduzir o uso geral dos animais e melhorar o bem-estar dos mesmos (CHAPMAN et al., 2012).

O programa 3R's originalmente descrito em 1959 (RUSSELL; BURCH, 1959) é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), que, de forma resumida, significa a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos no sentido de reduzir o sofrimento animal ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que, por fim, substituam os testes *in vivo* (CAZARIN, 2004).

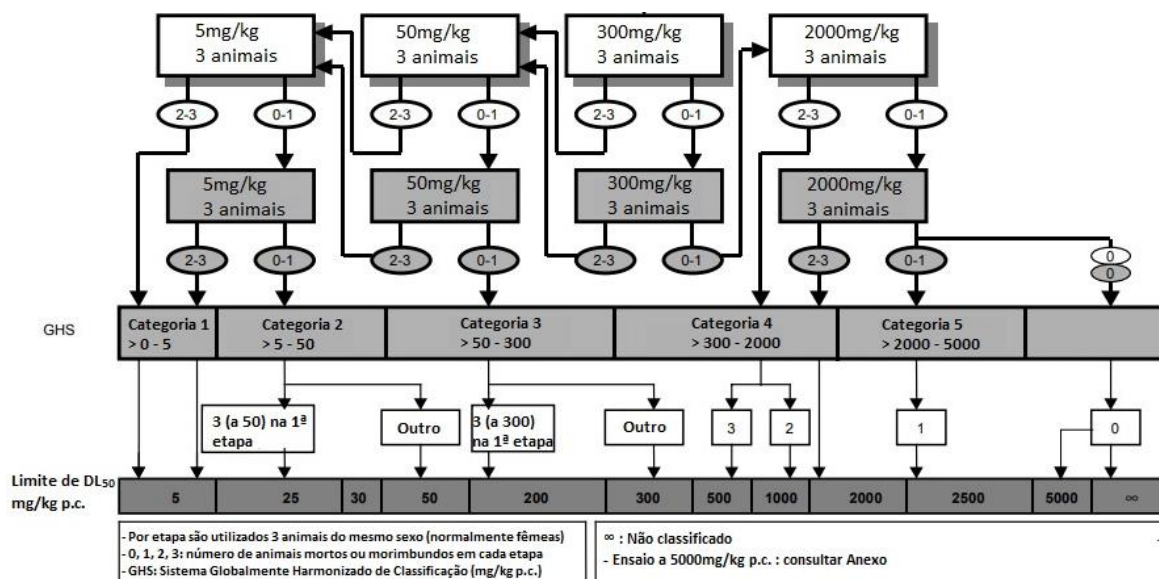
Em 2008, foi aprovada no Brasil, a lei "Arouca" (lei 11794/2008) proposta em 1995 pelo deputado Sérgio Arouca. A Lei estabelece a criação do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA), composto por pessoas vinculadas a entidades que defendem os diversos aspectos relevantes à experimentação animal, sendo o órgão máximo de definição e fiscalização das diretrizes éticas em experimentação animal no país. Além disso, o CONCEA utiliza das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os CEUAs julgam e aprovam projetos de pesquisa das universidades e outras instituições, de acordo com as diretrizes postuladas pelo CONCEA. Os CEUAs também têm uma composição diversificada (pesquisadores, leigos e religiosos) no intuito de dar ao julgamento dos projetos uma perspectiva

externa à acadêmica, muitas vezes enviesadas pela grande pressão científica (MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009).

Os modelos animais de doenças humanas foram usados não só para facilitar a seleção de compostos e permitir uma compreensão precoce do mecanismo de ação, mas também para avaliar a segurança (DENNY, STEWART, 2013). Assim, o uso de modelos animais de doença para avaliar a atividade *in vivo* e a toxicidade podem proporcionar uma melhor compreensão do índice terapêutico e, portanto, melhorar a seleção de dose clínica (CAVAGNARO, 2002). Os documentos de orientação regionais e harmonizados especificam que estudos de toxicidade definitivos devem ser realizados em pelo menos uma e, possivelmente, duas espécies de animais [um roedor e um não roedor (por exemplo, coelho, cachorro, macaco)]. No entanto, existem muitos casos onde apenas uma espécie (roedor) pode ser aceitável e uma espécie não roedora não é utilizada ou limitada ao uso do coelho (vacinas) ou do macaco (anticorpos) (CAVAGNARO, 2002; DENNY, STEWART, 2013). Os critérios para a seleção de espécies são tipicamente baseados em perfis metabólicos, perfis farmacocinéticos, tolerância de espécies e atividade farmacológica da molécula nas espécies em consideração para avaliação de segurança (DENNY, STEWART, 2013).

No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados com o produto teste com uma dose ou, eventualmente, em doses múltiplas em um intervalo de 24 horas, a substância é administrada via oral em três animais do mesmo sexo. O método usa doses pré-definidas (Figura 3) (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg e 2000 mg/kg) e os resultados permitem que uma substância seja classificada de acordo com o Sistema Global Harmonizado (GHS) para a classificação de produtos químicos que causam toxicidade aguda (OECD, 2001). O ensaio permite conhecer a forma de morte produzida pelo excesso dos produtos em órgãos alvo; as alterações comportamentais; fornece informações para avaliação dos riscos de exposição aguda ao produto e seleciona os valores de dose para estudos prolongados. Além disso, pode prever o mecanismo de toxicidade; indicar as lesões dos órgãos afetados, e verificar os efeitos tardios do tratamento e se há reversibilidade da resposta tóxica (DENNY, STEWART, 2013).

Figura 3 – Fluxograma de ensaio para teste de toxicidade oral aguda.



Fonte: (OECD, 2001).

A maior vantagem de se usar um animal para testar a segurança de produtos é que é um modelo inclusivo de todos os fatores envolvidos na exposição humana (DENNY, STEWART, 2013). A dosagem pode ser alcançada pela rota pretendida e o produto químico é distribuído e modificado por mecanismos fisiologicamente e bioquimicamente apropriados que determinam a concentração do(s) metabolito(s) químico(s) ou reativo(s) em todos os órgãos-alvo negativamente afetados. Apesar de algumas semelhanças, em muitas situações os animais são modelos preditivos inadequados e não fornecem informações reprodutivas em humanos (CAZARIN, 2004).

1.5 Aspectos regulatórios

Estudos toxicológicos são geralmente exigidos por agências reguladoras em todo o mundo antes que testes nos seres humanos possam começar ou progredir para um potencial candidato a novos medicamentos. No entanto, os critérios específicos para a condução dos estudos pré-clínicos variam de acordo com a região. Os três maiores blocos econômicos (Estados Unidos, Europa e Japão) no desenvolvimento de medicamentos, trabalharam juntos em um esforço contínuo para unificar as expectativas regulatórias para estudos pré-clínicos que foram publicados através do compêndio da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) (DENNY, STEWART, 2013).

Para a realização de ensaios toxicológicos é necessário o cumprimento de diretrizes estabelecidas por órgãos oficiais (ex: *Organization for Economic Cooperation and Development - OECD*, *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*). Essas organizações internacionais determinam um acordo sobre as diretrizes para análise de produtos químicos e regulação dos métodos alternativos nos blocos econômicos. No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dessas diretrizes é a ANVISA, essa, por sua vez, é observadora dos métodos da OECD (ANVISA, 2013).

O Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), criado no ano de 2011 tem como objetivo promover, divulgar e validar os métodos alternativos, além de treinamento e educação a respeito dos 3R's (BONES, MOLENTO, 2012). Além disso, por meio da Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012, o governo brasileiro criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), que tem por objetivos estimular a implantação de alternativas ao uso de animais por meio do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias; monitorar o desempenho dos laboratórios associados; promover a qualidade dos testes; incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial; e promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais, sendo o processo de validação realizado no âmbito do BraCVAM (BRASIL, 2012).

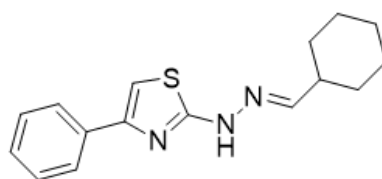
1.6 Substâncias testadas

1.6.1 Antifúngica

1.6.1.1 RN104

Heterociclo tiazol com atividade contra *Cryptococcus neoformans*, com MIC 0,9 μM , e *Cryptococcus gattii*, MIC 0.7 e 2.2 μM testado em nove cepas. Em estudo realizado, não demonstrou afetar a viabilidade das células VERO e de macrófagos murinos a concentrações até 100 μM , o que é refletido pelos valores de IC50 superiores a 100 μM (SÁ, 2015).

Figura 4 – Estrutura química RN104.



RN104

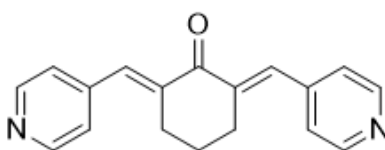
A criptococose é uma infecção fúngica oportunista ou primária causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*. No Brasil, a criptococose é uma doença fúngica com maior taxa de mortalidade em indivíduos soropositivos. O aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas é confrontado com um arsenal limitado de opções de tratamento, seja pelo aumento de resistência fúngica, seja pela toxicidade apresentada pelos agentes antifúngicos (SHENG, ZANG; 2011).

1.6.2 Anti-tripanosomatídeos

1.6.2.1 PCH

Cicloalcanona com atividade contra *Trypanosoma cruzi*, com IC_{50} superior a 250 μM e *Leishmania amazonenses* com IC_{50} 1,2 μM . Em ensaio de citotoxicidade de fibroblastos murinos, o IC_{50} foi de $23.9 \pm 9.6 \mu M$ (BRAGA et al, 2014).

Figura 5 – Estrutura química PCH.



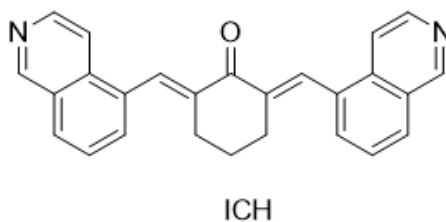
PCH

1.6.2.2 ICH

Cicloalcanona com atividade contra *Trypanosoma cruzi*, com IC_{50} $68.7 \pm 8.8 \mu M$ e *Leishmania amazonenses* com IC_{50} 8,4 μM . Em ensaio de citotoxicidade em

macrófagos murinos, o IC₅₀ foi 78.1 ± 9.9 µM, e em fibroblastos murinos, 187.5 ± 88.4 µM (BRAGA et al, 2014).

Figura 6 – Estrutura química ICH.



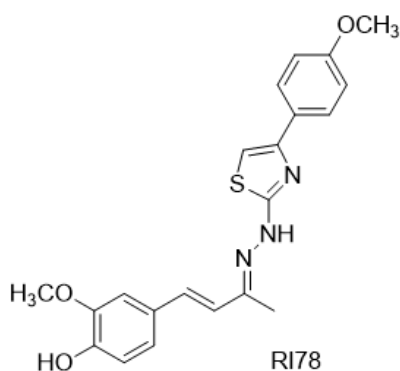
A leishmaniose e doença de Chagas são doenças protozoárias endêmicas com prioridades epidemiológicas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Existem medicamentos limitados disponíveis para o tratamento das doenças, os agentes terapêuticos ainda são inadequados devido à sua extrema toxicidade. Além disso, as cepas de parasitas resistentes aos medicamentos tornaram-se mais prevalentes (BRAGA *et al*, 2014).

1.6.3 Antioxidante

1.6.3.1 RI78

Antioxidante análoga à curcumina

Figura 7 – Estrutura química RI78.



São relatadas numerosas atividades biológicas, incluindo antioxidantes, antitumorais, antiinflamatórios e antiviral do produto natural curcumina. Embora seja seguro em doses mais elevadas e exiba múltiplas atividades biológicas, a curcumina ainda tem baixa biodisponibilidade, que tem sido uma área de pesquisa atrativa nos últimos anos. Uma série de esforços são feitos na modificação das características estruturais da curcumina afim de se obter um produto com maior biodisponibilidade. (ZY et al, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* de quatro moléculas com potencial terapêutico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico de quatro substâncias nas linhagens celulares LLC-PK1, HEP-G2, A549, NEURO-2A e H9C2 pelo ensaio do MTT;
- Para substância que revelar mais promissora no teste de MTT, realizar o teste de vermelho neutro conforme OECD 129;
- Extrapolar o resultado da dose obtida com a aplicação da OECD 129 como dose inicial para teste de toxicidade aguda, OECD 423.

3 ARTIGO

3.1 NOTA EXPLICATIVA

Seguindo as orientações do programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, a dissertação de mestrado deve conter um artigo técnico-científico a ser submetido em revista indexada no formato e com as normas a serem submetidas.

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (Fator de impacto 2015 2.66) intitulado:

“*IN VITRO AND IN VIVO TOXICITY OF INNOVATIVE MOLECULES USING GUIDELINE OECD 129*”.

Figura 8 – Normas para submissão de manuscritos.

The image shows a screenshot of a web interface for the journal Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (BCPT). At the top, the BCPT logo is displayed with the text 'Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology'. Below the logo, a navigation bar shows the user's name 'Daniela Tonholo as Author' with a 'CHANGE ROLE' link, and three menu items: 'DASHBOARD', 'PROFILE', and '[SIGN OUT]'. A central navigation menu contains eight icons with labels: Guidelines, Authors, Details, Keywords, Documents, Reviewers, Letter, and Send. The 'Guidelines' icon is highlighted. The main content area is titled 'Submission guidelines' and contains the following text: 'Read the guideline and check the box at the bottom of the page to confirm you will comply with these guidelines.' Below this is a section titled 'Aim and Scope' which describes the journal's focus on original scientific research in toxicology, basic and clinical pharmacology, and related fields. At the bottom of the page, the text 'CONFLICT OF INTEREST AND SOURCES OF FUNDING' is visible.

Fonte: <https://www.manuscriptmanager.net/sLib/v4/authguide.php>

IN VITRO AND IN VIVO TOXICITY OF INNOVATIVE MOLECULES USING GUIDELINE OECD 129

Tonholo, D.R.^a; Silva, I. R.^b; Azevedo, P. O.^a; Oliveira, R.B.^b; Tagliati, C.A.^a

^a Toxicology *in vitro* Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy - Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy - Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

ABSTRACT

In the development of new medicines, nine out of ten promising candidates entering the clinical phase will not receive approval. Reducing the failure of drug candidates using *in vitro* assays can reduce the unnecessary use of animals as well as predict toxic effects at preclinical stages. The objective of the present study was to evaluate MTT cytotoxicity of four new substances in the A549, H9C2, HEP-G2, LLC-PK1 and NEURO-2 cell lines. For the substance that showed the lowest cytotoxicity in the MTT test, the neutral red test according to OECD 129 was performed in order to extrapolate the result obtained as the initial dose for the acute toxicity test (OECD 423). An initial dose of 300 mg / kg did not promote observable toxic effects for the animals studied. On the other hand, the dose of 2000 mg / kg resulted in the death of one animal in each group; however, none of the groups presented macroscopic changes at necropsy. The results of the present study showed limitations of the neutral red test as a predictor of the initial dose for the acute toxicity study due to several factors such as limited *in vivo* bioavailability and generation of toxic metabolites.

KEY WORDS: Preclinical toxicology; *in vitro* and *in vitro* models; citotoxicity; OECD 129; OECD 423; alternative methods.

INTRODUCTION

Toxicity and clinical safety plays a major impact on the success of drug development. Toxicological studies in earlier stages of the research and development are necessary to prevent drug candidates with safety risk from entering clinical development (MORGAN *et al.*, 2011; SUTER *et al.*, 2004). Improving *in vitro* assays can reduce unnecessary animal testing, as well as reduce failure rates of new pharmaceutical candidates. Therefore, it is important to strive for improvements of *in vitro* techniques in a compound selection, which supports higher effectiveness during phases prior to clinical trials (CHAPMAN *et al.*, 2012). *In vitro* tests demonstrated several advantages, including controlled testing conditions; high level of standardization; reduction in variability between experiments; cost effectiveness; small amount of toxic waste and use of human cells and tissues (PEREZ, 2017). Another great advantage is the current availability of a large variety of strains in cell banks, which allows greater access and use of *in vitro* models, which means an alternative for toxicity assessments of many chemical substances (ARAUJO, 2014).

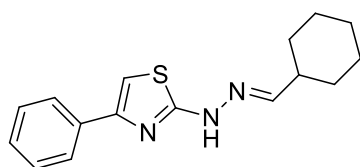
The concept of using *in vitro* cytotoxicity data to determine the initial doses for acute oral toxicity of rodents was discussed and evaluated at the International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessment of Acute Systemic Toxicity, in October 2000 (NIH, 2001). The neutral red test (NRU) is performed in a dose-response format to determine the concentration of the tested substance that reduces cell viability by 50% compared to the controls (IC_{50}). The IC_{50} value is used in a linear regression equation to estimate the oral LD_{50} value (dose that produces lethality in 50% of tested animals), which is then used to determine an initial dose for the acute oral toxicity test. This test has its method standardized by OECD 129 (OECD, 2010; STOKES, 2008).

The objective of the present study is to evaluate the cytotoxic effect of four substances – RN104, RI78, ICH, PCH – on the cell lines LLC-PK1 (pig kidney), HEP-G2 (human liver), A549 (human lung), NEURO-2A (mouse brain) and H9C2 (rat heart) by the MTT assay. The molecules chosen for the study comprises four innovative substances with antiparasitic, antifungal or antioxidant action. The substance that presented the lowest cytotoxicity in the MTT assay was then tested with neutral red uptake assay, according to OECD 129 guideline, in order to extrapolate the result obtained as the initial dose for the acute toxicity test (OECD 423).

MATERIAL AND METHODS

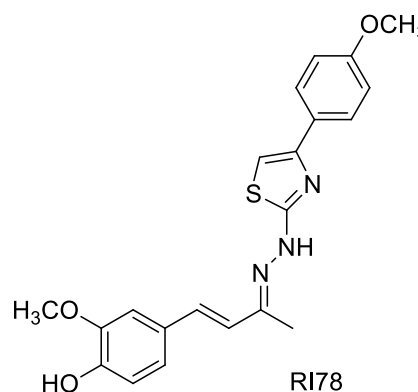
Bioactive substances

The four substances used in this study (Figure 1) were kindly provided by Laboratory of Pharmaceutical Chemistry of Faculty of Pharmacy of UFMG. The substances were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) 0.5%. A stock solution of each substance (RN104, RI78, PCH, ICH) was prepared with culture media (RPMI, DMEM or MEM, according to the cell used) to obtain a final concentration of 1.050 μM .



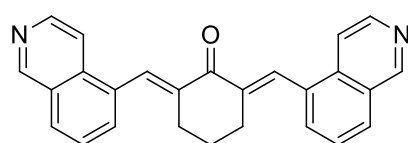
RN104

Heterocyclic Thiazole with activity against *Cryptococcus neoformans*, Minimum inhibitory concentration (MIC) 0.9 μM , and *Cryptococcus gattii* MIC 0.7 and 2.2 μM tested in nine strains (SÁ, 2015).



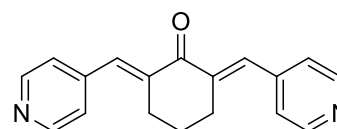
RI78

Curcumin analogue with antioxidant and antiinflammatory activities (unpublished data)



ICH

Cycloalkanone with activity against *Leishmania amazonensis* ($\text{IC}_{50} = 8.4 \mu\text{M}$) (BRAGA et al, 2014).



PCH

Cycloalkanone with activity against *Leishmania amazonensis* ($\text{IC}_{50} = 1.2 \mu\text{M}$) (BRAGA et al, 2014).

Fig.1 - Chemical structures of RN104, RI78, ICH and PCH and their main biological activity

Cells culture

LLC-PK1, HEP-G2, A549, NEURO 2A, H9C2 and BALB 3T3 (mouse embryonic fibroblast) cells were obtained from the cell bank of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). A549, NEURO 2A, H9C2 and BALB 3T3 were cultured in DMEM (GIBCO®) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO®). LLC-PK1 was cultured in MEM (GIBCO®) supplemented with 4% fetal bovine serum (GIBCO®).

HEP-G2 was cultured in RPMI (GIBCO®) supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO®). All media were supplemented with 1% stabilized antifungal/antibiotic solution 100x Sigma-Aldrich®. Cells were grown in 75 cm² bottles and incubated at 37 °C with 5% CO₂.

MTT Cytotoxicity Assay

Cells were plated in 96-well plates and incubated for 24 hours. The number of cells to be plated was determined by previous assay, where different amounts of cells were plated. Growth was observed within 24 hours, the concentration showing a confluence of 50 to 60% was selected: A549, Neuro-2A: 7.5x10³, LLC-PK1, HEP-G2: 5x10³ cells per well. The substances were added to the wells at concentrations of 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 µM and the plates were incubated for 24 hours. The negative control was culture medium and DMSO 0.5% (OECD, 129).

After 24 hours of exposure, the substances were removed from the wells, replaced with 200 µL/well of solution containing 0.5 mg/mL MTT and culture medium and incubated for 3 hours at 37 °C with 5% CO₂. The MTT solution was removed and 100 µL/well of DMSO was added for solubilization of the crystals. Absorbance was read at 570 nm in spectrophotometer (Molecular Devices SPECTRA Max PLUS 384).

Neutral Red Assay/ OECD 129

BALB 3T3 cells were plated in 96-well plate with 2.5x10³ cells per well and incubated for 24 hours. A stock solution of 1000 µg/mL of the substance was prepared in DMSO and tenfold serial dilutions were made (100; 10; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001 µg/mL) in DMEM. Cells were incubated for 48 hours. After incubation, medium was removed and neutral red solution (25 µg/mL) was added, incubated for 3 hours. The solution with neutral red was removed and 100 µL/well of desorb solution (water, glacial acetic acid and ethanol) was added for solubilization of the crystals. Absorbance was read at 540 nm in the spectrophotometer (Molecular Devices SPECTRA Max PLUS 384). The negative control used was culture medium and DMSO 0.5%. As a positive control, sodium lauryl sulfate (SLS) was used; subsequently ten tests were performed to standardize the substance as recommended by the OECD 129. In all tests performed with the sample, a positive control plate was made at concentrations 6.8; 10; 14.7; 21.5; 31.6; 46.4; 68.1; and 100 µg/mL.

A second test was performed in which the cell plating steps were identical to the first test. A first concentration was chosen after the IC_{50} , successive dilutions were made according to the dilution factor 1.47 (${}^6\sqrt{10}$). These concentrations were applied to the cells and followed the steps of incubation and reading according to the first test. The IC_{50} value was calculated and used in the following log regression equation to estimate log LD in mg/kg:

$$\log LD_{50} \left(\frac{mmol}{kg} \right) = 0.439 \log IC_{50} (mM) + 0.621$$

Acute toxicity/OECD 423

Eighteen mice of the Swiss strain, females weighing 24 to 28 g, were used from the Central Animal House of the Federal University of Minas Gerais. Animals were kept in collective cages (3 animals each) with temperature control at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, receiving standard feed and filtered water at will. Animals were fasted 3 hours before exposure to the substance. The experimental protocol followed OECD 423 and was submitted and approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals/CEUA number 198/2017. According to the OECD 129 guidance, after the neutral red test *in vitro*, the established starting dose was 300 mg/kg follow by 2000 mg/kg. The groups of the first test were a control (C1), receiving filtered water with DMSO 0.5%; and a group receiving dose of 300 mg/kg (G1) of RN104. The group of the second test receiving a dose of 300 mg/kg (G2) of RN104. The groups of the third test were a control (C2), receiving filtered water with DMSO 0.5%; and a group receiving dose of 2000 mg/kg (G3) of RN104. The group of the fourth test receiving dose of 2000 mg/kg (G4) of RN104. The substance was solubilized in 0.5% DMSO and filtered water. Each group consisted of three animals.

Animals were observed in the periods of 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h, and every 24 h for 14 days after administration. The general disposition, motor coordination, muscle tone, reflexes and activity of the autonomic nervous system were evaluated. Food consumption and weight of the animals were observed on days 1, 2, 4, 8, 12 and 15. On day 15, the animals were weighed, anesthetized with a mixture of xylazine (75 mg/Kg) and ketamine (10 mg/Kg) and euthanized by cervical dislocation, their bodies were dissected and the organs (brain, heart, liver, lung and kidney) were observed macroscopically. The liver and kidneys were removed and weighed. The relative mass of the organs of each animal was calculated by the percentage of total weight.

Statistical analysis

Statistical significance was determined by one way ANOVA test, followed by the Tukey test performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, Inc); $p < 0.05$ was set as the criterion of significance.

RESULTS

MTT Cytotoxicity Assay

The MTT assay measured the viability of cells by incorporation of dye in the mitochondria. The concentration that resulted in 50% cell growth inhibition (IC_{50}) was determined (Table 1).

Compostos	A549	H9C2	NEURO-2A	LLC-PK1	HEP-G2
RN104	> 105	> 105	> 105	97.3	> 105
RI78	> 105	59.2	70.3	< 1	> 105
ICH	> 105	> 105	> 105	77.4	> 105
PCH	27.0	36.7	< 1	20.4	5.4

Table 1 - IC_{50} (μ M) values of RN104, RI78, ICH, PCH

The substance that exhibited lower cytotoxicity profile in the MTT test was RN104 (Figure 2). For RN104 the IC_{50} for the cell line LLC-PK1 was 97.3 μ M, in other cells line the IC_{50} was greater than 105 μ M, indicating low toxicity.

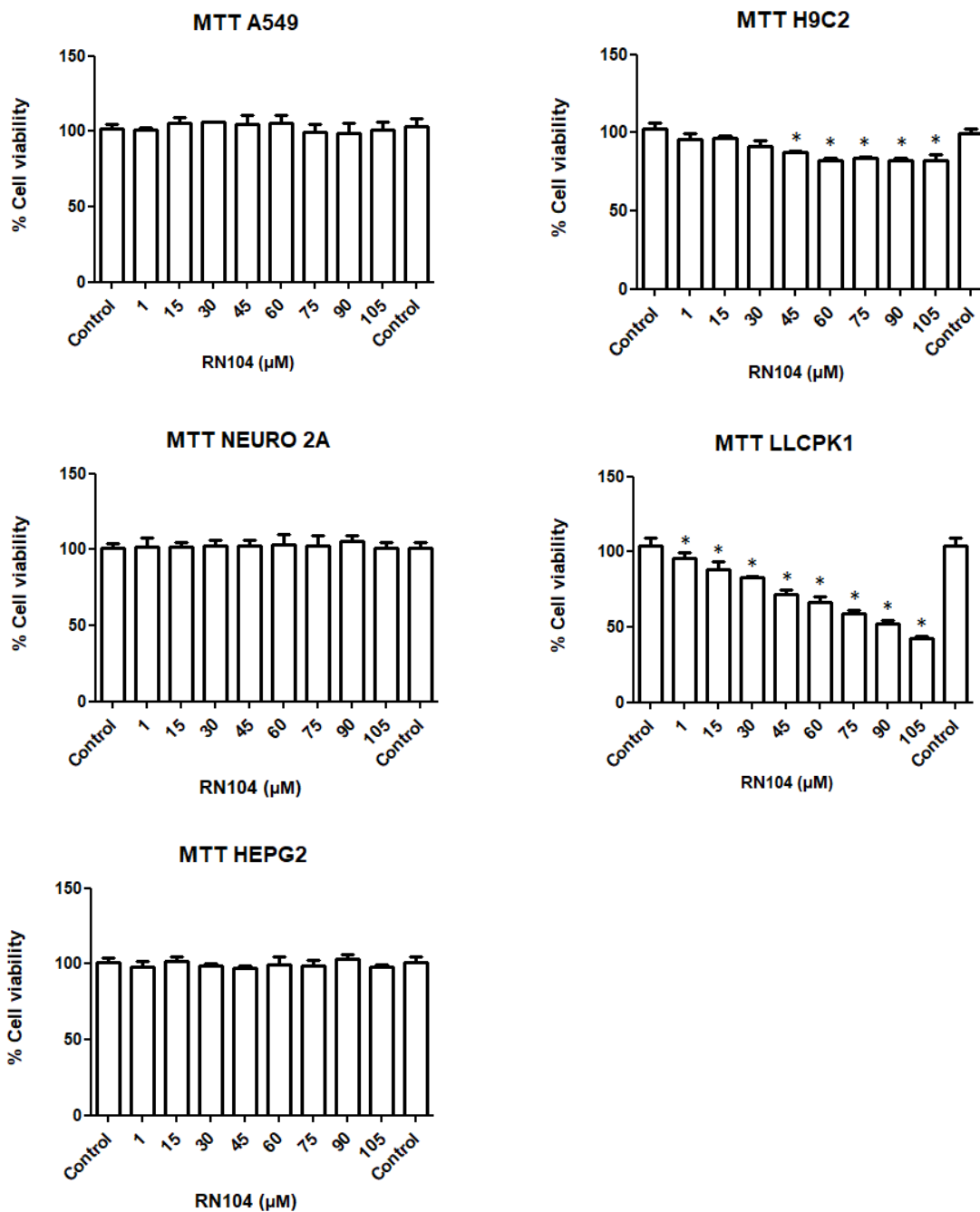


Fig. 2 - Evaluation of cell viability by MTT metabolism for substance RN104. Concentration/response curves of cell lines A549, H9C2, HEP-G2, NEURO 2A, LLC-PK1, respectively. Cells were exposed to increasing concentrations (µM) of the substance for 24 hours. Assay performed in three independent experiments. Negative control (untreated cells) were considered with 100% cell viability. (* p < 0.05, significantly different values in relation to the control group)

Neutral Red Uptake Assay/ OECD 129

Based on the results obtained in the MTT assay, the substance RN104 was selected for further testing.

The SLS was used as positive control and presented an IC₅₀ value of 37.3 µg/mL, close to that found in the literature (39,3 µg/mL) (OECD, 2010). Toxicity is observed at concentrations above 21.5 µg/mL (Figure 3).

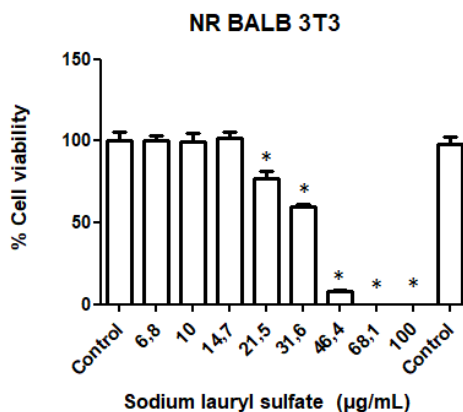


Fig. 3 - Evaluation of cell viability by Neutral Red in the presence of sodium lauryl sulfate (SLS). Cells were exposed to increasing concentrations (µg/mL) of SLS for 48 hours. Assay performed in ten independent experiments. Negative control (untreated cells) was considered with 100% cell viability. (* p <0.05, significantly different values in relation to the control group).

The effects of RN104 on the cell viability of Balb 3T3 cells were determined using neutral red assay and showed low toxicity up to a concentration of 4,7 µg/mL (Figure 4).

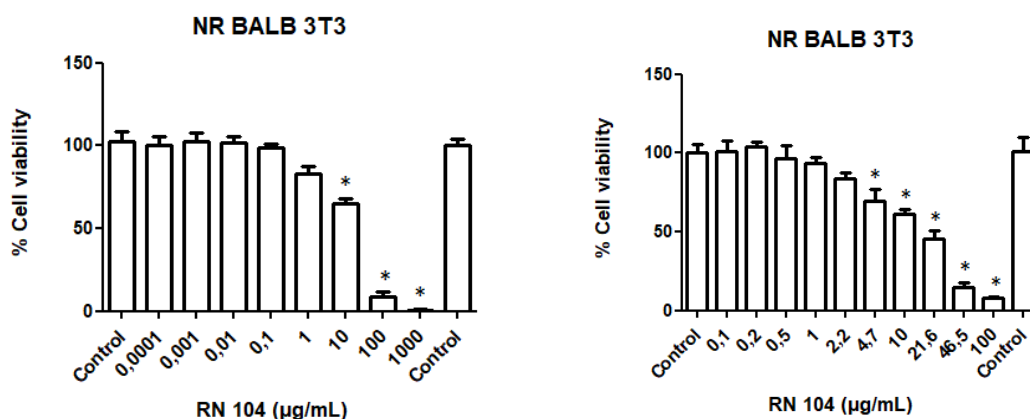


Fig. 4 - Evaluation of cell viability by Neutral Red in the presence of the substance RN104. Cells were exposed to increasing concentrations (µg/mL) of RN104 for 48 hours. Assay performed in three independent experiments. Negative control (untreated cells) was considered with 100% cell viability. In the first test the concentrations were 0,0001 up to 1000 µg/mL, in second test the concentrations were 0,1 up to 100 µg/mL. (* p <0.05, significantly different values in relation to the control group).

The value of IC₅₀ found for RN104 was 16.8 µg/mL and used in the log regression equation to estimate log LD in mg/kg. The calculated LD₅₀ value was 308 mg/kg. The

starting dose for the acute toxicity test is the next dose lower than the estimated LD₅₀ in the default dose progression, in that case, 300 mg/kg.

Acute oral toxicity/OECD 423

Regarding the results of acute oral toxicity, no death or any other sign of toxicity were observed in control animals (groups C1 and C2) nor in animals treated with 300 mg/kg (groups G1 and G2). No changes were detected in the general activity, awareness and sensitivity of the mice. In the animals from the groups treated with RN104 at dose 2000 mg/kg (groups G3 and G4), one animal in each group died on day two, the rest of the animals showed no signs of toxicity during the experiment. The necropsy of all animals showed no macroscopic alteration that justified the histopathological study of the organs selected for analysis (kidneys and liver). In accordance with the results obtained, the GHS classification of the tested substance is category 5, LD₅₀ in the range of 2000-5000 mg/kg.

There was no significant change in the weight of the animals during the experiment, as well as in feed intake, except in groups G3 and G4 due to the death of animals (Figures 5 and 6). The percentages in relation to the organs weight remained constant, presenting no significant differences (Figures 7 and 8).

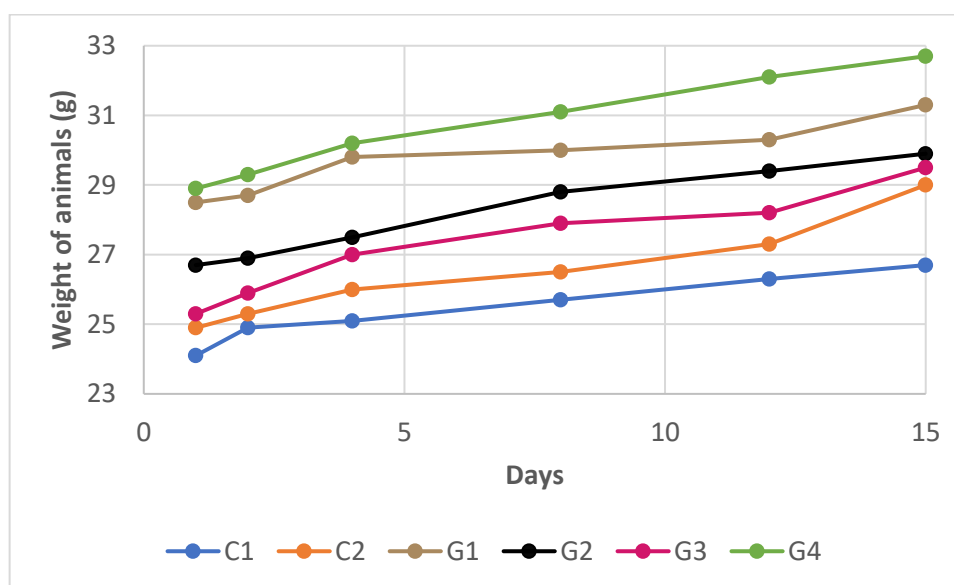


Fig. 5 - Weight of the animals during the experiment (g). On day two, the animals that died in the group G3 and G4 weighed 26.9 g and 31.2 g respectively. (* $p < 0.05$, significantly different values in relation to the control group).

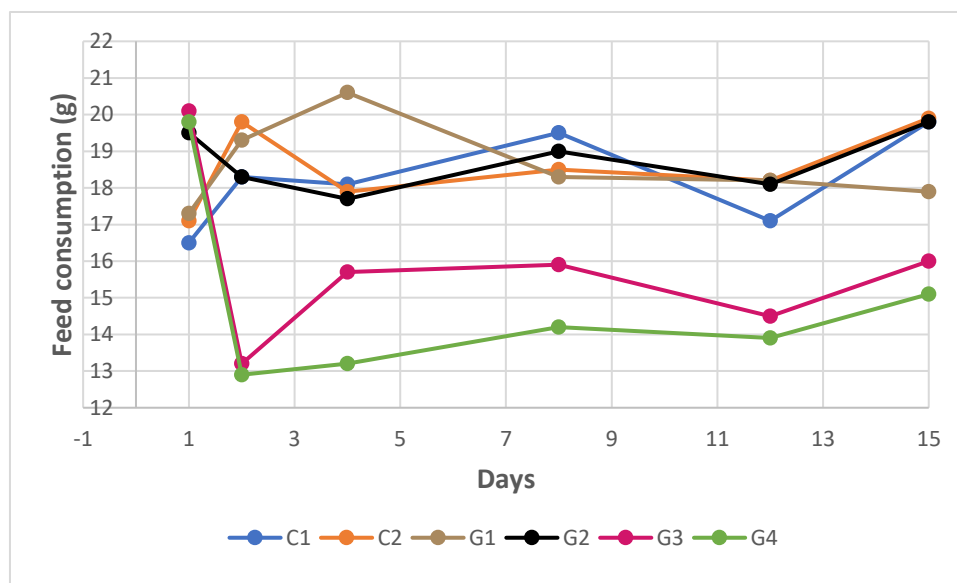


Fig. 6 - Feed intake during the experiment (g). From day two, the feed intake of G3 and G4 group decreased due to the death of an animal. (* $p < 0.05$, significantly different values in relation to the control group).

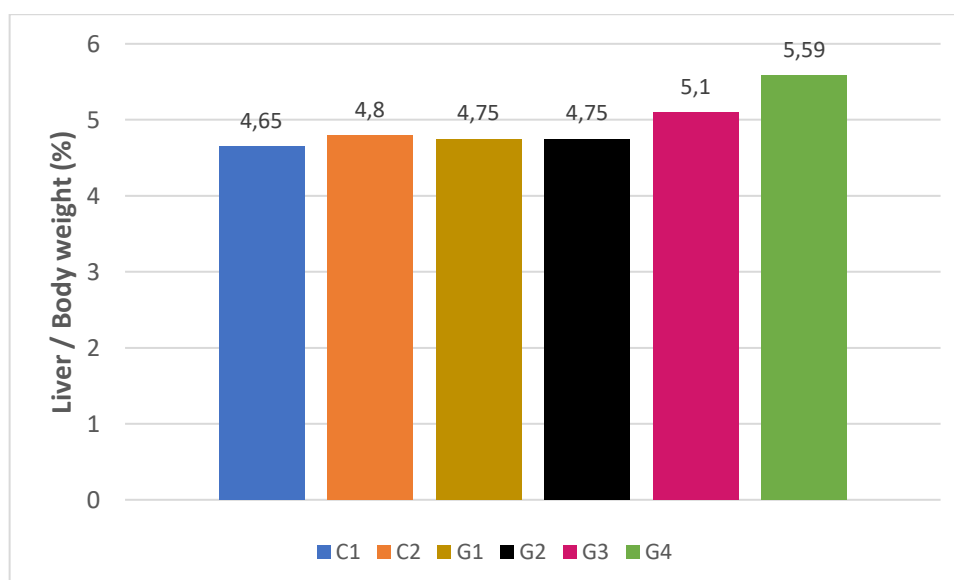


Fig. 7 - Animal data on day of euthanasia: media of percentage of liver weight in relation to total weight. On the day two, percentage of liver weight from necropsy of animal dead of the groups G4 and G5 was 5.28% and 4.48%, respectively. (* $p < 0.05$, significantly different values in relation to the control group).

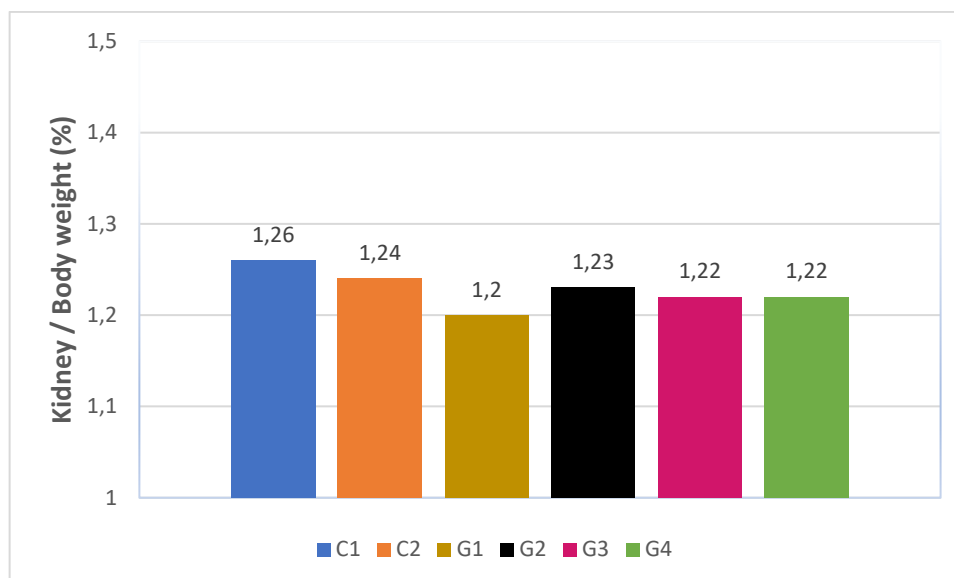


Fig. 8 - Animal data on day of euthanasia: media of percentage of kidney weight in relation to total weight. On the day two, percentage of kidney weight from necropsy of animal dead of the groups G4 and G5 was 1.24% and 1.22%, respectively. (* $p < 0.05$, significantly different values in relation to the control group).

DISCUSSION

Thiazolyhydrazone derivatives, such as RN104, demonstrated low cytotoxicity toward other cell lines (VERO cells) previously studied, with IC_{50} value greater than $100 \mu\text{M}$ (SÁ *et al*, 2015). Cytotoxic substances cause adverse effects due to the interference in essential processes for cell survival, proliferation and function. These effects may interfere with cell membrane and cytoskeletal integrity; changes in metabolism, synthesis and degradation of cellular constituents and cell division (OECD, 2010). The regenerative potential of cells is evaluated by cell growth and measured by assays that evaluate their metabolic activity, viability and cell size (TONDER *et al*, 2015).

The MTT test can be used in the initial phase of screening of new molecules. However, the assay has limitations such as interference of external factors and must always be accompanied by other tests (RISS *et al*, 2013). Stepanenko and Dmitrenko (2015) have stated that there might be an over or underestimation of cell viability by the MTT assay and its significance relies on a cell line, a time point of viability quantification and other experimental parameters. Different cell lines exhibit different sensitivity to the same compound since the action of a substance will be perceived in a particular way by each cell type.

In the NRU assay, cytotoxicity is expressed as a concentration-dependent in the uptake of dye neutral red (NR), after substance exposure. Thus, cell death or inhibition of cell growth decreases the amount of NR retained by the cells. The assay provides important information of cell integrity and growth inhibition and key mechanisms for acute toxicity (MCCARVILL *et al.*, 1990; MANNERSTROM *et al.*, 2017; SCHRAGE *et al.*, 2011). Deaths were recorded days after the start of treatment, and only one of the groups may be due to an eventual idiosyncratic or biological variable (PIRES-JÚNIOR *et al.*, 2012).

According to EISENBRAND *et al.* (2002), the cytotoxicity should be the first parameter evaluated to assess the potential toxicological risk *in vivo* since it is possible to estimate the toxicity of substances by *in vitro* observation of damages causing impairment of cellular functions, replacing the use of animals in laboratory experiments.

In acute toxicity test, the systemic toxicity of a substance can also be manifested by reduction in water consumption, behavioral alteration, apathy, bad fur condition and alteration of the relative mass of the organs. Body weight is one of the most used parameters in toxicological evaluations to indicate early toxic effects of a given substance in the animal organism (PIRES-JÚNIOR *et al.*, 2012, MANNERSTROM *et al.*, 2017).

Our results of neutral red test show a probable underestimation of the initial dose calculated from the acute toxicity study, since the GHS (*Globally Harmonized System*) classification of the tested substance is category 5, LD₅₀ in the range of 2000-5000 mg/kg, and not category 4 like estimated by neutral red test (OECD 129), LD₅₀ in the range of 300-2000 mg/kg. The mechanistic relevance of the 3T3 NRU assay shows to be limited to basal cytotoxicity induced through many different toxicity pathways common to the majority of cell type. The BALB 3T3 cell line have lack of xenobiotic metabolism and does not capture specific mechanisms of action relating molecular targets found only in certain tissues (PRIETO, 2013; MANNERSTROM *et al.*, 2017).

Therefore, is important to first better understand the modes of action and disturbance of biological pathways leading to acute systemic toxicity and then to develop predictive *in vitro* and *in silico* alternative approaches (NIH, 2001; PRIETO, 2013). It's known that substances inducing acute toxicity by mechanisms specific only to certain cell types or tissues or requiring metabolic activation may not be correctly predicted (ECHA, 2016).

In this context, since there are no studies of the RN104 metabolic activation or its toxicity mechanism, that possibility should be considered.

In addition, the very low aqueous solubility of the RN104 may also have interfered with the *in vivo* results, since poor solubility can lead to low bioavailability, resulting in suboptimal drug delivery (KALEPU, NEKKANTI, 2015; SCHRAGE *et al*, 2011), supporting the earlier indications that the 3T3 NRU test method is most suitable for soluble chemicals (ANON, 2007; OECD 2010). This factor associated to the lack of metabolism of BALB 3T3 cells, previously mentioned, may justify the underestimation of the toxic dose for the acute toxicity study observed in our study.

Our results are in accordance with previous studies described in the literature that shows limitations in neutral red assay how a predictor of starting dose to acute toxicity study. Schrage *et al.* (2011) analyzed the usefulness of the *in vitro* testing for the initial dose prediction for an *in vivo* study and the potential reduction in animal use that this would generate. The study showed that for only 59% (108 of 203 substances studied) the cytotoxicity assay predicted the initial dose for acute toxicity testing, however, the use of a standard starting dose of 300 mg/kg by default (without previous cytotoxicity testing) would have been almost as useful. The study resulted in increased need of animal when *in vitro* cytotoxicity data were used for the prediction of starting doses. This differs from the published data of the validation set outlined in the ICCVAM 2006 Report (ICCVAM, 2006), where the use of the cytotoxicity assay for estimating the starting dose for the *in vivo* testing reduced the need for animal use by about 10%. Reliance on the nominal chemical concentrations in *in vitro* assays as a marker of bioactivity may distort potential *in vivo* effects of these chemicals due to contrasts in pharmacokinetic factors like clearance, protein binding and bioavailability (WETMORE, 2014; PRIETO, 2013).

In recent study, Mannerstrom *et al.* (2017) showed significant differences between mouse 3T3 fibroblasts and human BJ fibroblasts in their ability to predict cytotoxicity. This finding supports the earlier conclusion that 3T3 NRU test method gives a high false-positive rate and this restricts its use in classification and labelling (SJOSTROM *et al*, 2008). Due to biological differences between species, chemical substances can cause very different responses. The concordance of observed effects on many toxic endpoints between humans and various animal species is about 50% (MANNERSTROM *et al*, 2017). The absence of predictivity observed in some human

clinical outcomes with preclinical animal efficacy findings has led critics to questioning of the fundamental role that animal-based studies have played in the preclinical field for some therapeutic areas (POUND and BRACKEN, 2014; EVERITT, 2015).

Although our results are not according to the OECD 129, RN104 showed safety after OECD 423. Therefore, additional studies of chronic toxicity, histopathological analysis and evaluation of biochemical parameters are recommended for a better understanding of repeated dose toxicity.

CONCLUSION

The antifungal RN104 showed low cytotoxicity profile for the cell lines studied in the MTT test. The results showed that the neutral red assay have limitations as a predictor of the initial dose for the acute toxicity study due to several factors such as limited *in vivo* bioavailability and generation of toxic metabolites, which can generate the equivocated results. Despite this, the substance has proven to be safe and promising. Therefore, further studies of bioavailability, repeated dose toxicity, histopathological analysis and evaluation of biochemical parameters are recommended for a better understanding of the safety of RN104 substance.

REFERENCES

ANON, 2007 - Background Review Document (BRD): Validation of Neutral Red Uptake Test Methods NIH Publication No. 07-4518, 20 Nov 2006. Available at <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/in-vitro-validation/brd/index.html> Accessed 20 Jan 2018

ARAUJO, G. L. *et al.* Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55-62, Jan/Mar 2014

BRAGA, S. F. P. *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.52, n.2, Apr/Jun 2016

CHAPMAN, K. L. *et al.* Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.66, n.1, p.88-103, Jun 2012

EISENBRAND, G. *et al.* Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.193-236, 2002

ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, 2016. Available at https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf Accessed 20 Mar 2018

EVERITT, J.I. The Future of Preclinical Animal Models in Pharmaceutical Discovery and Development: A Need to Bring In Cerebro to the *In Vivo* Discussions. **Toxicologic Pathology**, V.43, n.1, p. 70-77, Jan 2015

ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods ICCVAM Test Method Evaluation Report (TMER): In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Testing, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006. Available at https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmmer/at-tmer-complete.pdf Accessed 18 Feb 2018

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v.5, n.5, p. 442-453, Sep 2015

MANNERSTROM, M. *et al.* Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. v. 121, p. 109-115, Mar 2017

MCCARVILL, J.T. *et al.* Morphological transformation of BALB/3T3 cells by various procarcinogens in the presence of a rat liver S-9 activation system. **Environmental Mol Mutagenesis**, v. 16, p. 304-310, Nov 1990

MORGAN, S. *et al.* The cost of drug development: a systematic review. **Health Policy**, v.100, n.1, p.14-17, Apr 2011

National Institutes of Health - NIH 2001. The report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Available at: < https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/workshop-feb09/acutewksprpt.pdf > Accessed 1 May 2018

OECD – Organization For Economic Co-operation and Development. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, nº 129. Paris, 2010. Available at <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en)> Accessed 10 Jan 2017

PEREZ, M.G *et al.* Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 43-46, Aug 2017

PIRES-JÚNIOR *et al.* Evaluation of Acute Toxicity of Hexanic Extract of Fruits of *Melia azedarach* (Miliaceae) in mice. **Brazilian Animal Science Magazine**. v. 13, n. 4, Dec 2012

POUND, P., BRACKEN, M. B. (2014). Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research. **BMJ** 348, g3387, p. 1-3, May 2014

PRIETO, P. *et al.* Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD50 > 2000 mg/kg): Results of an ECVAM validation study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, p. 344-365, Jan 2013

RISS, T. L *et al.* Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**. Bethesda, May 2013.

SÁ, N. P.; LINO, C. I; FONSECA, N. C. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans in vitro*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n.102, p. 233-242, Sep 2015

SCHRAGE, A. *et al.* Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data. *Alternative to laboratories animals*. v. 39, n.3, p. 273-95, Jul 2011

SJOSTROM, M. *et al.* Estimation of human blood LC50 values for use in modeling of in vitro-*in vivo* data of the ACuteTox project. **Toxicol In Vitro**, v.22, p. 1405-1410, Jan 2008

STEPANENKO, A.A.; DMITRENKO, V.V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, v. 574, n. 2, p. 193-203, Dec 2015

STOKES, W. S. *et al.* Neutral Red Uptake Cytotoxicity Tests for UNIT 20.4 Estimating Starting Doses for Acute Oral Toxicity Tests. **Alternative Methodologies in Toxicology**, v.20, n.20.4, Mai 2008.

SUTER, L.; BABISS, L. E.; WHELLDON, E. B. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. **Chemistry & Biology**, v.11, p.161-171, Feb 2004

TONDER, A. V.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v.8, p. 2-10, Feb 2015

WETMORE, B.A. Quantitative in vitro-to-*in vivo* extrapolation in a high-throughput environment, **Toxicology**, Jun 2014

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRACO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ORGANIZAÇÕES REPRESENTATIVAS DE PESQUISA CLÍNICA, 2017. Disponível em <<http://www.abracro.org.br/pt-br/materias-abracro/730investimento-em-pesquisa-para-cada-novo-medicamento-chega-a-6-2-bilhoes-de-reais>> Acesso em 1 mar. 2018.

ANDERSEN, M.E.; KREWSKI, D. The Vision of Toxicity Testing in the 21st Century: Moving from Discussion to Action. **Toxicological Sciences**, v. 117, n. 1, p. 17-24, set. 2010.

ANDRADE, E. L.; *et al.* Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of medical and biological research**, v. 49, n. 12, dez. 2016.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**, jan. 2013. Disponível em<<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em 20 jul. 2017.

ARAUJO, G. L.; *et al.* Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2014.

ARROWSMITH, J. Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 328-329, mai. 2011.

BAHUGUNA, A. *et al.* MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 12, p. 115, abr. 2017.

BONES, V. C.; MOLENTO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, v. 10, n. 1, p. 103-112, jul./dez. 2012.

BRAGA, S. F. P. *et al.* Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. n. 71, p. 282-289, jan. 2014.

BRAGA, S. F. P. *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 52, n. 2, abr./jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. **Diário Oficial da União**

CAVAGNARO, J. A. Preclinical safety evaluation of biotechnology- derived pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 469-475, jun. 2002.

CHAPMAN, K. L. *et al.* Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 88-103, jun. 2012.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.3, jul./set. 2004.

DENNY, K.H., STEWART, C. W. **Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development**. A Comprehensive EGuide To Toxicology In Preclinical Drug Development. 1. ed. Amsterdã: Elsevier., 2013. 1024 p.

EMA – European Medicinal Agency. **Guideline on repeated dose toxicity**. Committee for Human Medicinal Products (CHMP), mar. 2010. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf> Acesso em 26 Ago 2017.

HORNBERG, J.J. *et al.* Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, p. 1-6, jan. 2014.

ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. **ICCVAM Test Method Evaluation Report (TMER): In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Testing**. Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006. Disponível em <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmmer/at-tmer-complete.pdf> Acesso em:18 fev. 18.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 442-453, set. 2015.

KNUDSEN, T.B. *et al.* FutureTox II: *In vitro* Data and *In silico* Models for Predictive Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 143, n. 2, p. 256-267, jan. 2015

KRAMER, A.J.; SAGARTZ, E.J.; MORRIS, L.D. The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. **Nature**, v. 6, p. 636 - 649, ago. 2007.

LAVANDEIRA, Fernanda Márcia Ferreira. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. 2014 Universidade Fernando Pessoa. Porto. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

MARQUES, R.G.; MORALES, M.M.; PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 69-74, fev. 2009.

MORGAN, S. *et al.* The cost of drug development: a systematic review. **Health Policy**, v. 100, n. 1, p. 14-17, abr. 2011.

NIH – National Institute for Environmental Health Sciences. **Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity**, NIH Publication No. 01-4499, 2001. Disponível em <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/finalrpt/finalall0801.pdf> Acesso em 28 ago. 2017.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, nº 129**. Paris, 2010. Disponível em <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon(2010)20&doclanguage=en)> Acesso em: 10 jan. 2017.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, nº 423**. Paris, 2001. Disponível em <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon\(2001\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon(2001)4&doclanguage=en)> Acesos em: 5 dez. 2017.

PEREZ, M.G *et al.* Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 43-46, ago. 2017.

PRIETO, P. *et al.* EURL ECVAM strategy to replace, reduce and refine the use of animals in the assessment of acute mammalian systemic toxicity. **JRC Science And Policy Report**, 2014. Disponível em <<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-strategy-papers/strategy-acute-mammalian-systemic-toxicity>> Acesso em 20 ago. 2017.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1959. Special Edition, 1959.

SÁ, N. P.; LINO, C. I; FONSECA, N. C. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* *in vitro*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 102, p. 233-242, set. 2015.

STONE, V.; JOHNSTON H., ROEL P. F. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, n. 7, p. 613-626, jun. 2009.

STURLA, S.J. *et al.* Systems Toxicology: From Basic Research to Risk Assessment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 314-329, jan. 2014.

STOKES, W. S. *et al.* Neutral Red Uptake Cytotoxicity Tests for UNIT 20.4 Estimating Starting Doses for Acute Oral Toxicity Tests. **Alternative Methodologies in Toxicology**, v. 20, n. 20.4, mai. 2008.

SUTER, L.; BABISS, L. E.; WHELLDON, E. B. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 161-171, fev. 2004.

SHENG. C, ZHANG. W, New Lead Structures in Antifungal Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 733-766, jan. 2011

ZHANG, L. *et al.* Emerging approaches in predictive toxicology. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 1, p. 679-688, jul. 2014.