

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/03/2028.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP Instituto de Química - Câmpus de
Araraquara**

LARINE NAMIALA ARRUDA FERNANDES

**Avaliação da toxicidade do peptídeo GVL-1 conjugado com o Transativador de
transcrição do HIV (TAT) em zebrafish (*Danio rerio*)**



Araraquara

2026

LARINE NAMIALA ARRUDA FERNANDES

Avaliação da toxicidade do peptídeo GVL-1 conjugado com o Transativador de transcrição do HIV (TAT) em zebrafish (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ives Charlie da Silva

Araraquara

2026

F363a

Fernandes, Larine Namiala Arruda

Avaliação da toxicidade do peptídeo GVL-1 conjugado com o Transativador de transcrição do HIV (TAT) em zebrafish (Danio rerio) / Larine Namiala Arruda Fernandes. -- Araraquara, 2026
191 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Ives Charlie da Silva

1. Agentes antineoplásicos. 2. Cardiotoxicidade. 3. Câncer. 4.
Toxicologia. 5. Zebrafish. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa avalia a toxicidade de peptídeos com potencial anticancerígeno usando o modelo alternativo zebrafish, contribuindo para o desenvolvimento sustentável (ODS 3). Os resultados auxiliam a triagem ética e eficiente de novos fármacos, fortalecendo a biotecnologia nacional e a inovação científica com impacto social e translacional.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study evaluates the toxicity of anticancer peptide candidates using the zebrafish alternative model, contributing to sustainable development (SDG 3). The findings support ethical and efficient drug screening, strengthening biotechnology research, scientific innovation, and translational impact in health sciences.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da toxicidade do peptídeo GVL1 conjugado com o Transativador de Transcrição TAT do HIV-1 em zebrafish (Danio rerio)

AUTORA: LARINE NAMIALA ARRUDA FERNANDES

ORIENTADOR: IVES CHARLIE DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, área: Química pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. IVES CHARLIE DA SILVA (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a MÔNICA RODRIGUES FERREIRA MACHADO (Participação Virtual)

Unidade acadêmica especial de Ciências biológicas / Universidade Federal de Jataí - UFJ - Jataí

Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO (Participação Virtual)

Universidade Brasil - Descalvado

Araraquara, 30 de março de 2026.

Documento assinado digitalmente
 **IVES CHARLIE DA SILVA**
Data: 24/04/2026 08:47:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **MONICA RODRIGUES FERREIRA MACHADO**
Data: 01/04/2026 10:20:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO**
Data: 28/04/2026 14:34:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	LARINE NAMIALA ARRUDA FERNANDES 20/03/2000
Nacionalidade	Brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Fernandes, Larine Fernandes, L.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Bioquímica e Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (15) 99837-9278
Currículo Lattes	URL http://lattes.cnpq.br/5009068611192176
ORCID	URL https://orcid.org/0009-0007-3926-2381
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
06/2022	Formação acadêmica: Ciências Biológicas, Bióloga Universidade Federal de Jataí
12/2017	Formação complementar: Técnico em Farmácia, Técnica em Farmácia ETEC Sales Gomes
12/2017	Formação complementar: Técnico em Química, Técnica em Farmácia ETEC Sales Gomes
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS	

REUNIÃO ANUAL DA Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 54., 2025, (Águas de Lindóia).

Evaluation of the toxicity of ruthenium complexes in zebrafish. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

BIOTECH AGRO-HEALTH – ROTAS DA BIOTECNOLOGIA, 2., 2025, (Ribeirão Preto).

Da bancada ao mercado: pesquisa translacional com zebrafish para triagem toxicológica de compostos inovadores com potencial anticâncer. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2024, (Araraquara).

Explorando a toxicidade da Asparaginase em Zebrafish: FET TEST. 2024. (Trabalho apresentado em pôster).

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 54., 2025, (Águas de Lindóia).

Evaluation of the toxicity of a nanoparticle containing bevacizumab in zebrafish. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UNESP, 2025, (Araraquara).

Peptídeos anticâncer em Zebrafish: Um estudo de Toxicidade. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

CONGRESSO FARMACÊUTICO DA UNESP, 10., 2025, (Araraquara).

Avaliação toxicológica de derivados do cinamaldeído com potencial anticâncer: tiossemicarbazona e tiadiazol em embriões de Danio rerio pelo FET test. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

JORNADA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA DA UNESP, 9., 2025, (Araraquara).

Avaliação toxicológica de derivados do cinamaldeído com potencial anticâncer: tiossemicarbazona e tiadiazol em embriões de Danio rerio pelo FET test. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

BIOTECH AGRO-HEALTH – ROTAS DA BIOTECNOLOGIA, 2., 2025, (Ribeirão Preto).

Rota sintética alternativa para tiadiazóis: estudo modelo com derivados do cinamaldeído com potencial para aplicações em biotecnologia. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

REUNIÃO ANUAL DA Sociedade Brasileira de Química, 48., 2025, (Campinas).

Synthesis and Characterization of Thiosemicarbazones-Ruthenium (2) Complexes used as Potential Anticancer Agents: in vitro and in vivo Evaluation. 2025. (Trabalho apresentado em pôster).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, pela orientação científica, confiança e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, ainda, pela oportunidade de integrar um projeto de pesquisa de caráter inovador, viabilizado no âmbito de uma instituição de excelência e com o suporte de uma agência de fomento de reconhecida relevância nacional, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), experiência fundamental para minha formação acadêmica e científica.

Aos alunos de Iniciação Científica do laboratório, agradeço a colaboração, convivência e apoio nas atividades experimentais.

Agradeço à minha orientadora de graduação, Professora Doutora Mônica Machado, cujos ensinamentos, incentivo e formação científica foram fundamentais para que eu adquirisse a base necessária para o ingresso e desenvolvimento no mestrado.

Agradeço à minha amiga, Doutora Lorraine Valadares, pelo apoio contínuo, pelas discussões científicas e pela disponibilidade em me apoiar ao longo de todo o processo experimental. Sua colaboração, iniciada ainda na graduação e mantida durante o mestrado, foi de grande importância para a condução deste estudo.

A todos os pesquisadores que colaboraram com este trabalho, disponibilizando compostos inovadores para avaliação experimental, expressei meu sincero agradecimento pela confiança e parceria científica, que enriqueceram significativamente esta pesquisa.

Agradeço ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Araraquara, pela infraestrutura, suporte institucional e ambiente acadêmico que possibilitaram a realização deste estudo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº **2024/10055-1**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Por fim, agradeço à minha família, pelo apoio incondicional, compreensão e incentivo constante, fundamentais para a conclusão desta etapa tão importante da minha formação pessoal e profissional.

“The only necessity for success is the willingness to suffer a thousand failures!”
(Kataro Uchikoshi)

RESUMO

O desenvolvimento de novos agentes anticâncer permanece como um desafio significativo, especialmente devido à elevada toxicidade sistêmica associada às terapias convencionais e à limitação na seletividade dos compostos. Nesse contexto, a leucemia destaca-se como uma neoplasia de alta relevância clínica, reforçando a necessidade de estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes. Entre as abordagens emergentes, os peptídeos bioativos têm sido amplamente investigados devido ao seu potencial de interação com alvos celulares específicos e capacidade de modulação de processos biológicos relacionados à progressão tumoral. O modelo zebrafish (*Danio rerio*) tem se destacado como uma ferramenta eficiente para triagem toxicológica *in vivo* em estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos, permitindo a avaliação integrada de múltiplos parâmetros em um organismo vertebrado, com alta reprodutibilidade e relevância translacional. Inicialmente, foi realizada a triagem de mais de 28 compostos inovadores com potencial anticâncer utilizando o Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET), com o objetivo de avaliar seus perfis toxicológicos. A partir dessa etapa, os peptídeos GVL-1 e o peptídeo penetrante de célula TAT foram selecionados para aprofundamento, considerando seu potencial biológico e características estruturais relevantes. O TAT, derivado da proteína transativadora do HIV-1, destaca-se por sua capacidade de promover internalização intracelular de moléculas bioativas, sendo amplamente utilizado como vetor de entrega. Nesse contexto, o peptídeo GVL-1 foi conjugado ao TAT com o objetivo de integrar atividade biológica e capacidade de permeação celular em um único sistema molecular. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da conjugação entre GVL-1 e TAT sobre o perfil toxicológico *in vivo*. Para isso, embriões de zebrafish foram expostos aos peptídeos isolados GVL-1, TAT e ao bioconjugado GVL-1+TAT por até 120 horas, sendo avaliados quanto à sobrevivência, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, teratogenicidade e alterações morfométricas. Os resultados demonstraram que os peptídeos precursores apresentaram toxicidade moderada, enquanto o bioconjugado não apresentou letalidade nem alterações significativas nas concentrações testadas. Esses achados indicam que a estratégia de conjugação foi capaz de modular a toxicidade, promovendo um perfil biológico mais seguro. Assim, o presente estudo evidencia o potencial da conjugação com CPPs como abordagem promissora para o desenvolvimento de compostos com melhor equilíbrio entre eficácia e segurança, além de reforçar o zebrafish como modelo eficiente para triagem e validação pré-clínica inicial de candidatos terapêuticos anticâncer.

Palavras-chave: zebrafish; *Danio rerio*; toxicidade; compostos anticâncer; cardiotoxicidade.

ABSTRACT

The development of new anticancer agents remains a significant challenge, particularly due to the high systemic toxicity associated with conventional therapies and the limited selectivity of these compounds. In this context, leukemia stands out as a neoplasm of high clinical relevance, underscoring the need for safer and more effective therapeutic strategies. Among emerging approaches, bioactive peptides have been extensively investigated due to their potential to interact with specific cellular targets and their ability to modulate biological processes related to tumor progression. The zebrafish (*Danio rerio*) model has emerged as an efficient tool for in vivo toxicological screening in the early stages of drug development, allowing for the integrated assessment of multiple parameters in a vertebrate organism, with high reproducibility and translational relevance. Initially, more than 28 innovative compounds with anticancer potential were screened using the Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) to evaluate their toxicological profiles. Following this stage, the GVL-1 peptides and the cell-penetrating peptide TAT were selected for further investigation, considering their biological potential and relevant structural characteristics. TAT, derived from the HIV-1 transactivator protein, is notable for its ability to promote intracellular internalization of bioactive molecules and is widely used as a delivery vector. In this context, the GVL-1 peptide was conjugated to TAT with the aim of integrating biological activity and cell penetration capacity into a single molecular system. Thus, the present study aimed to evaluate the impact of the GVL-1–TAT conjugation on the in vivo toxicological profile. To this end, zebrafish embryos were exposed to the isolated peptides GVL-1, TAT, and the GVL-1+TAT bioconjugate for up to 120 hours and evaluated for survival, cardiotoxicity, neurotoxicity, teratogenicity, and morphometric changes. The results demonstrated that the precursor peptides exhibited moderate toxicity, while the bioconjugate showed no lethality or significant changes at the tested concentrations. These findings indicate that the conjugation strategy was able to modulate toxicity, promoting a safer biological profile. Thus, the present study highlights the potential of conjugation with CPPs as a promising approach for the development of compounds with a better balance between efficacy and safety, in addition to reinforcing zebrafish as an efficient model for screening and initial preclinical validation of anticancer therapeutic candidates.

Keywords: zebrafish; *Danio rerio*; toxicity; anticancer compounds; cardiotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Projeção do número estimado de casos de leucemia no mundo, por sexo e faixa etária, no período de 2022 a 2050	16
Figura 2. Estimativa do número global de novos casos de leucemia, ambos os sexos, no período de 2022 a 2045.....	17
Figura 3. Mecanismos de ação de peptídeos anticancerígenos	20
Figura 4. Desenho experimental da placa de 96 poços	43
Figura 5. Imagens representativas de larvas de <i>D. rerio</i> às 120 horas pós-exposição (120 hpe) utilizadas para mensuração morfométrica.....	45
Figura 6. Avaliação toxicológica do composto NS2424 (TAT) em embriões de <i>D. rerio</i> na sobrevivência	51
Figura 7. Avaliação toxicológica do composto GVL-1 em embriões de <i>D. rerio</i> na sobrevivência.....	52
Figura 8. Avaliação toxicológica do composto conjugado GVL-1 + TAT em embriões de <i>D. rerio</i> na sobrevivência	53
Figura 9. Curvas dose-resposta comparativas (120 hpe) para NS2424 (TAT), GVL-1 e GVL-1 + TAT	55
Figura 10. Efeito da exposição do peptídeo NS2424 (TAT), GVL-1 e o conjugado GVL-1 + TAT sobre o movimento involuntário as 24 hpe de embriões de <i>D. rerio</i>	58
Figura 11. Efeito da exposição do peptídeo NS2424-TAT sobre a frequência cardíaca de embriões de <i>D. rerio</i> as 48 hpe.....	59
Figura 12. Efeito da exposição do peptídeo GVL-1 sobre a frequência cardíaca de embriões de <i>D. rerio</i> 48 hpe.....	60
Figura 13. Efeito da exposição do peptídeo conjugado GVL-1 + TAT sobre a frequência cardíaca de embriões de <i>D. rerio</i> as 48 hpe	61
Figura 14. Cardiotoxicidade comparativa – Δ BPM em relação ao DMSO às 48 hpe em embriões de <i>D. rerio</i>	64
Figura 15. Taxa teratogênica dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós fertilização (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações do peptídeo NS2424 (TAT)	66
Figura 16. Taxa teratogênica dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós fertilização (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações do peptídeo GVL-1.....	67
Figura 17. Taxa teratogênica dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós fertilização (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações do peptídeo conjugado GVL-1 + TAT.....	68
Figura 18. Tipos de teratogênias dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós fertilização (hpf) até 120 hpf, expostos em diferentes concentrações do peptídeo NS2424 (TAT).....	72
Figura 19. Tipos de teratogênias dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós fertilização (hpf) até 120 hpf, expostos em diferentes concentrações do peptídeo GVL-1.	74
Figura 20. Tipos de teratogênias dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós fertilização (hpf) até 120 hpf, expostos em diferentes concentrações do peptídeo conjugado GVL-1 + TAT.....	76
Figura 21. Imagens representativas de larvas de <i>D. rerio</i> expostas aos compostos NS2424 (TAT), GVL-1 e ao conjugado GVL-1 + TAT nas concentrações C1–C5, além dos respectivos controles (E3 e DMSO), avaliadas no período de 24 a 120 horas pós-exposição (hpe).	78
Figura 22. Parâmetros morfométricos quantificados em 120 hpe em larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao composto NS2424 (TAT).....	80

Figura 23. Parâmetros morfométricos quantificados em 120 hpe em larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao composto GVL-1.....	82
Figura 24. Parâmetros morfométricos quantificados em 120 hpe em larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao composto conjugado GVL-1 + NS2424 (TAT).	84
Figura 25. Análise multivariada da morfometria em larvas de <i>D. rerio</i> expostas aos compostos TAT, GVL-1 e GVL-1 + TAT às 120 hpe. (A) PCA global incluindo todas as variáveis morfométricas.....	91
Figura 26. Tamanho de efeito da cardiotoxicidade dos compostos TAT, GVL-1 e do conjugado GVL-1 + TAT em larvas de <i>D. rerio</i> , calculado a partir da razão AH/DMA (área do coração/área corporal total)	92
Figura 27. Representação integrada do perfil funcional dos peptídeos GVL-1, TAT e do conjugado GVL-1+TAT com base em parâmetros de atividade antibacteriana, atividade antiviral, capacidade de erradicação de biofilme, citotoxicidade <i>in vitro</i> e toxicidade <i>in vivo</i>	95
Figura 28. Efeitos da exposição à L-asparaginase no desenvolvimento embrionário de <i>D. rerio</i>	118
Figura 29. Avaliação da neurotoxicidade induzida pela L-asparaginase em embriões de <i>D. rerio</i> por meio da análise de movimentos involuntários às 24 horas pós-exposição (hpe).....	119
Figura 30. Avaliação da cardiotoxicidade induzida pela L-asparaginase em larvas de <i>D. rerio</i>	120
Figura 31. Avaliação da teratogenicidade induzida pela L-asparaginase em embriões de <i>D. rerio</i>	121
Figura 32. Frequência dos diferentes fenótipos teratogênicos observados em embriões de <i>D. rerio</i> expostos à L-asparaginase ao longo do desenvolvimento embrionário.....	122
Figura 33. Progressão temporal integrada dos principais endpoints de toxicidade do desenvolvimento em embriões de <i>D. rerio</i> expostos à L-asparaginase	123
Figura 34. Efeito de diferentes concentrações dos complexos RuH (P1) RuMe (P2), RuEt (P3) e RuPh (P4) na sobrevivência de <i>D. rerio</i>	126
Figura 35. Efeito da exposição dos complexos RuH(P1) RuMe (P2), RuEt(P3) e RuPh(P4) sobre o movimento involuntário de embriões de <i>D. rerio</i>	127
Figura 36. Efeito da exposição dos complexos RuH (P1) RuMe (P2), RuEt (P3) e RuPh (P4) sobre a frequência cardíaca de embriões de <i>D. rerio</i>	128
Figura 37. Taxa teratogênica dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós exposição (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações dos complexos RuH (P1) RuMe (P2), RuEt (P3) e RuPh (P4).....	128
Figura 38. Efeito de diferentes concentrações dos complexos (1) RuMoH, (2) RuMoMe, (3) RuMoEt, (4) RuMoPh na sobrevivência de <i>D. rerio</i>	131
Figura 39. Efeito da exposição dos complexos (1) RuMoH, (2) RuMoMe, (3) RuMoEt, (4) RuMoPh sobre o movimento involuntário de embriões de <i>D. rerio</i>	132
Figura 40. Efeito da exposição dos complexos (1) RuMoH, (2) RuMoMe, (3) RuMoEt, (4) RuMoPh sobre a frequência cardíaca de embriões de <i>D. rerio</i>	132
Figura 41. Taxa teratogênica dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós-exposição (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações dos complexos (1) RuMoH, (2) RuMoMe, (3) RuMoEt, (4) RuMoPh.....	133
Figura 42. Tipos de teratogênias dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós-exposição (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações dos complexos (1-a) RuMoH, (2-b) RuMoMe, (3-c) RuMoEt, (4-d) RuMoPh.....	133
Figura 43. Análise de sobrevivência embrionária em <i>D. rerio</i> expostos aos compostos GVL-2, GVL-3, TAT (NS2424) e seus respectivos conjugados (GVL-2+TAT e GVL-3+TAT) durante o desenvolvimento inicial.....	137
Figura 44. Curva dose-resposta de sobrevivência de embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos compostos GVL-2, GVL-3, seus respectivos conjugados com o peptídeo TAT (GVL-2 + TAT	

e GVL-3 + TAT) e ao peptídeo penetrante de células NS2424 (TAT).....	137
Figura 45. Avaliação da neurotoxicidade em embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos compostos GVL-2, GVL-3, TAT (NS2424) e seus respectivos conjugados (GVL-2+TAT e GVL-3+TAT).....	139
Figura 46. Avaliação da cardiotoxicidade em embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos compostos GVL-2, GVL-3, TAT (NS2424) e seus respectivos conjugados (GVL-2+TAT e GVL-3+TAT).....	141
Figura 47. Avaliação da taxa teratogênica em embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos compostos GVL-2, GVL-3, TAT (NS2424) e seus respectivos conjugados (GVL-2+TAT e GVL-3+TAT).....	143
Figura 48. Tipos de alterações teratogênicas observadas em embriões de <i>D. rerio</i> expostos aos compostos GVL-2, GVL-3, TAT (NS2424) e seus respectivos conjugados (GVL-2+TAT e GVL-3+TAT).....	146
Figura 49. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo TSH_NS2089 na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. rerio</i>	150
Figura 50. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo TSH_NS2089 no movimento involuntário e na frequência cardíaca de <i>D. rerio</i>	151
Figura 51. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo TSH_NS2089 na taxa teratogênica e tipos de teratogênias de <i>D. rerio</i>	152
Figura 52. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo TSH_NS2053 na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. rerio</i>	153
Figura 53. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo TSH_NS2053 no movimento involuntário e na frequência cardíaca de <i>D. rerio</i>	153
Figura 54. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo TSH_NS2053 na taxa teratogênica e tipos de teratogênias de <i>D. rerio</i>	154
Figura 55. Efeito de diferentes concentrações da nanopartícula na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. rerio</i>	157
Figura 56. Efeito da exposição da nanopartícula sobre o movimento involuntário e frequência cardíaca de embriões de <i>D. rerio</i>	158
Figura 57. Taxa teratogênica e tipos de teratogênias dos embriões de <i>D. rerio</i> avaliados as 24 horas pós-exposição (hpe) até 120 hpe, expostos em diferentes concentrações da nanopartícula.....	158
Figura 58. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIMTD e CIMENTSC na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. rerio</i>	162
Figura 59. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIMTD e CIMENTSC no movimento involuntário e frequência cardíaca de <i>D. rerio</i>	163
Figura 60. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIMTD e CIMENTSC na taxa teratogênica e tipos de teratogênias de <i>D. rerio</i>	165
Figura 61. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIHTD e CIHTSC na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. rerio</i>	168
Figura 62. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIHTD e CIHTSC no movimento involuntário e frequência cardíaca de <i>D. rerio</i>	170
Figura 63. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIHTD e CIHTSC na taxa teratogênica e tipos de teratogênias de <i>D. rerio</i>	171
Figura 64. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIDTD e CIDTSC na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. rerio</i>	175
Figura 65. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIDTD e CIDTSC no movimento involuntário e frequência cardíaca de <i>D. rerio</i>	176
Figura 66. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIDTD e CIDTSC na taxa	

teratogênica e tipos de teratogênias de <i>D. rerio</i>	178
Figura 67. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIPHTD e CIPHTSC na sobrevivência e taxa de eclosão de <i>D. Rerio</i>	181
Figura 68. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIPHTD e CIPHTSC movimento involuntário e frequência cardíaca de <i>D.rerio</i>	183
Figura 69. Efeito de diferentes concentrações dos compostos CIPHTD e CIPHTSC na taxa teratogênica e tipos de teratogênias de <i>D. Rerio</i>	185

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações nominais dos compostos NS2424-TAT (TAT), GVL-1 e do conjugado GVL-1+TAT avaliados no ensaio de toxicidade embrionária em zebrafish (FET), bem como a conversão para unidades molares e estimativa de dose por embrião.....	40
Tabela 2. Parâmetros toxicológicos determinados no FET Test (120 hpe) para os peptídeos TAT, GVL-1 e o conjugado GVL-1 + TAT em embriões de <i>D.rerio</i>	53
Tabela 3. Comparação do perfil biológico dos peptídeos GVL-1, TAT (NS2424) e do conjugado GVL-1+TAT em diferentes modelos experimentais com base em dados previamente reportados na literatura.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – anticancer peptides (peptídeos anticâncer)
AVMA – American Veterinary Medical Association
BVZ – bevacizumabe
CCNS – fármacos não ciclo-celular específicos
CCS – fármacos ciclo-celular específicos
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CL₅₀ – concentração letal média
CPP – cell-penetrating peptides (peptídeos penetrantes de célula)
D. rerio – *Danio rerio*
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
DPF – dias pós-fertilização
E3 – meio embrionário E3
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FET – Fish Embryo Acute Toxicity Test
GLOBOCAN – Global Cancer Observatory
hpf – horas pós-fertilização
hpe – horas pós-exposição
IARC – International Agency for Research on Cancer
IC₅₀ – concentração inibitória média
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
INCA – Instituto Nacional de Câncer
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IQ – Instituto de Química
LIFACQ – Laboratório Integrado de Farmacotécnica e Controle de Qualidade
LLA – leucemia linfocítica aguda
LLC – leucemia linfocítica crônica
LMA – leucemia mieloide aguda
LMC – leucemia mieloide crônica
NOABC – Laboratório de Química Inorgânica (NOABC)
OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development
ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
pH – potencial hidrogeniônico
SDG – Sustainable Development Goals
TG – Test Guideline
TPA – troca parcial de água
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UNESP – Universidade Estadual Paulista
USP – Universidade de São Paulo
WIPO – World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	15
1.1	Câncer: panorama global e desafios terapêuticos	15
1.2	Leucemia e limitações terapêuticas atuais	15
1.3	Terapias antineoplásicas e limitações clínicas	18
1.4	Peptídeos bioativos como estratégias terapêuticas Inovadoras no câncer.....	19
1.4.1	Peptídeos escolhidos – tat, gvl-1 e o conjugado gvl-1 + tat	20
1.5	Cardiotoxicidade associada a terapias anticâncer e relevância da avaliação precoce.....	22
1.6	Limitações do pipeline tradicional de descoberta de fármacos e necessidade de modelos translacionais mais eficientes: modelos pré-clínicos e gargalos translacionais.....	23
1.7	Ensaio <i>in vitro</i> na triagem inicial de candidatos em pesquisas toxicológicas	23
1.8	Zebrafish (<i>danio rerio</i>) como modelo experimental em pesquisas toxicológicas.....	25
1.8.1	Avaliação fenotípica de cardiotoxicidade em zebrafish e métodos funcionais de imagem.....	26
1.9	Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET) e princípios éticos	26
1.10	Justificativa.....	28
1.11	Objetivos.....	29
1.11.1	Objetivo geral	29
1.11.2	Objetivos específicos	30
3.	Materiais e métodos	30
3.1	Levantamento de dados	30
3.1.1	Bases de dados	31
3.1.1.1	Livros e artigos de periódicos	31
3.1.1.2	Patentes.....	32
3.1.1.2.1	Recorte dos últimos dez anos (2015-2025)	32
3.2.1	Parte experimental	34
3.2.1.5	Eutanásia dos animais	36
3.2.2	Compostos avaliados.....	37
3.2.3	Fish embryo acute toxicity test (FET)	38
3.2.3.1	Procedimento de exposição.....	38
3.2.3.2	Avaliação por etapa	43
	Análises de sobrevivência embrionária.....	43
	Análises de neurotoxicidade	43
	Análises de cardiotoxicidade	44
	Análises de teratogenicidade	44
3.2.3.3	Pós- exposição e fixação.....	44
3.2.3.3	Análises morfométricas	45
3.2.4	Integração com dados <i>in vitro</i>	45
3.2.5	Análises estatísticas	46
	Comparação dos perfis dose–resposta entre os compostos	54

Perspectivas futuras	109
Referências	110
Apêndices.....	116
Anexo 2	189
Resultados complementares de outros modelos experimentais realizados por outros.....	189
Grupos parceiros de alguns compostos	189

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: panorama global e desafios terapêuticos

O câncer constitui um dos principais problemas de saúde pública em escala global, com impacto crescente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Nas últimas décadas, observou-se um aumento expressivo na incidência da doença, estimando-se um crescimento superior a 20%, com projeções que indicam mais de 25 milhões de novos casos anuais até 2030 [1,2]. Dados consolidados pelo Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), coordenado pela International Agency for Research on Cancer (IARC), apontam que aproximadamente um em cada cinco indivíduos desenvolverá câncer ao longo da vida, evidenciando a magnitude e a universalidade desse desafio sanitário [2,3].

Além do aumento da incidência, a mortalidade associada às neoplasias permanece elevada em nível global, refletindo limitações terapêuticas ainda existentes, a heterogeneidade biológica dos tumores e os efeitos adversos associados aos tratamentos atualmente disponíveis [4,5]. Esse cenário reforça que, apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas, o câncer continua representando uma importante causa de morbimortalidade, demandando esforços contínuos em pesquisa científica, inovação terapêutica e desenvolvimento de estratégias mais eficazes, seletivas e seguras. Esse panorama evidencia a necessidade de investimentos em ciência translacional e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que aliem eficácia antitumoral à redução de toxicidades sistêmicas, especialmente em doenças de curso crônico ou com elevada taxa de sobrevida, nas quais os efeitos tardios do tratamento assumem relevância clínica significativa.

1.2 Leucemia e limitações terapêuticas atuais

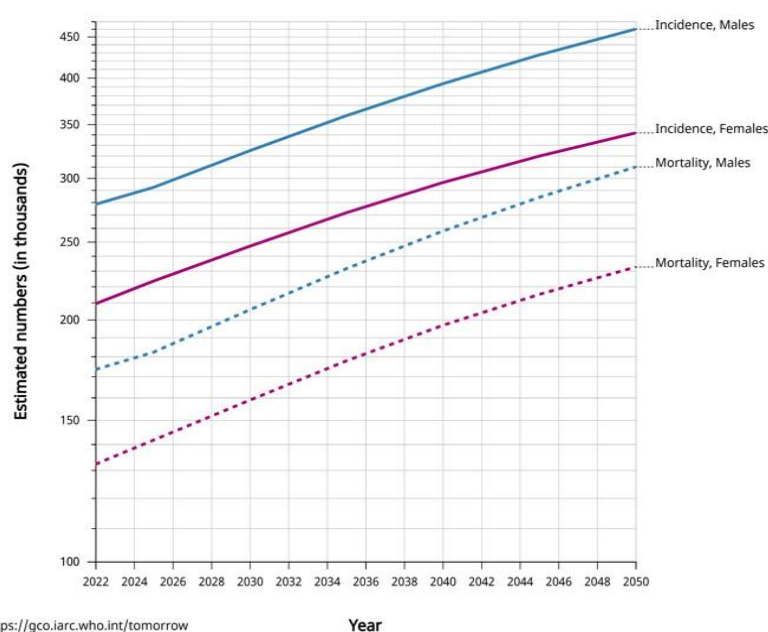
Entre as diferentes neoplasias, a leucemia destaca-se por sua complexidade biológica e impacto clínico significativo. Trata-se de uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação descontrolada de células hematopoéticas anômalas, que se acumulam na medula óssea e comprometem a produção normal de células sanguíneas [6]. Essa condição interfere diretamente na homeostase hematológica e imunológica, resultando em manifestações clínicas sistêmicas e elevada morbidade.

Atualmente, são reconhecidos mais de doze subtipos de leucemia, sendo os principais a leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica

aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC), os quais diferem quanto à origem celular, evolução clínica, perfil molecular e resposta terapêutica [7,8]. A distribuição desses subtipos varia de acordo com a faixa etária, sendo a LLA mais prevalente em crianças, enquanto LMA e LLC são mais frequentemente diagnosticadas em adultos e idosos [37-38].

Em termos epidemiológicos, a leucemia representou, em 2020, aproximadamente 475 mil novos casos em todo o mundo, correspondendo a cerca de 2,5% de todos os cânceres diagnosticados globalmente [6,9]. Projeções recentes indicam que esse número continuará a crescer nas próximas décadas, acompanhando o envelhecimento populacional e a transição epidemiológica observada em diversos países. As estimativas globais apontam um aumento progressivo tanto na incidência quanto na mortalidade por leucemia entre 2022 e 2050, em ambos os sexos, conforme evidenciado pelas projeções do GLOBOCAN (Figura 1).

Estimated numbers from 2022 to 2050, Males and Females, age [0-85+]
Leukaemia



Cancer Tomorrow | IARC - <https://gco.iarc.who.int/tomorrow>
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2026



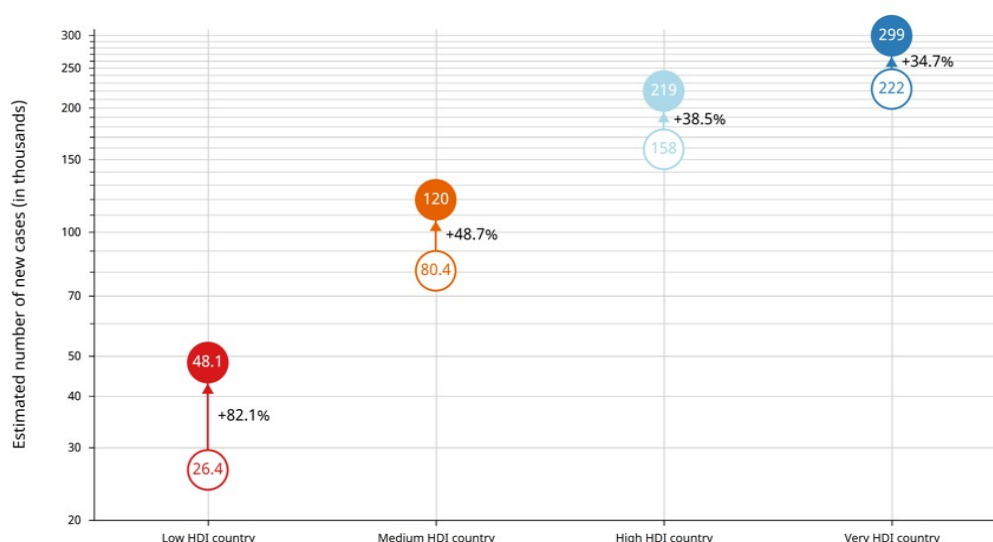
Figura 1. Projeção do número estimado de casos de leucemia no mundo, por sexo e faixa etária, no período de 2022 a 2050. O gráfico apresenta a evolução projetada do número absoluto de casos de leucemia em diferentes grupos etários, estratificados por sexo, evidenciando tendência de aumento progressivo ao longo das próximas décadas, com maior impacto nas faixas etárias adultas e idosas. Fonte: Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), International Agency for Research on Cancer (IARC).

No contexto nacional, dados oficiais indicam milhares de óbitos anuais atribuídos à leucemia no Brasil, configurando um relevante problema de saúde pública e impondo desafios significativos ao sistema de saúde [10,11]. Esse impacto é agravado pela necessidade de

tratamentos prolongados, hospitalizações frequentes e acompanhamento clínico de longo prazo.

A análise das projeções globais segundo o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) revela ainda importantes desigualdades na evolução da doença. Países classificados com baixo e médio IDH apresentam aumentos proporcionais mais acentuados no número estimado de novos casos entre 2022 e 2045, quando comparados a países de alto e muito alto IDH (Figura 2). Esses dados refletem não apenas mudanças demográficas, mas também diferenças no acesso ao diagnóstico precoce, tratamento adequado e infraestrutura de saúde, ressaltando a necessidade de estratégias terapêuticas mais acessíveis e seguras em contextos diversos.

Estimated number of new cases from 2022 to 2045, Both sexes, age [0-85+]
Leukaemia



Cancer Tomorrow | IARC - <https://gco.iarc.who.int/tomorrow>
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2026



Figura 2. Estimativa do número global de novos casos de leucemia, ambos os sexos, no período de 2022 a 2045. Observa-se um crescimento contínuo no número de novos diagnósticos de leucemia ao longo do período analisado, refletindo o envelhecimento populacional e a persistência de fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença. **Fonte:** Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), International Agency for Research on Cancer (IARC).

Adicionalmente, a distribuição regional dos novos casos de leucemia evidencia que continentes como Ásia, África e América Latina deverão concentrar aumentos expressivos no número absoluto de diagnósticos nas próximas décadas [39]. Esse crescimento, especialmente pronunciado em regiões com sistemas de saúde mais vulneráveis, reforça o impacto global da

doença e a urgência no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas com melhor perfil de segurança.

A etiologia da leucemia envolve uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, incluindo exposição à radiação ionizante, uso prévio de quimioterápicos, tabagismo, infecções virais e síndromes genéticas hereditárias [12,13]. Embora os tratamentos convencionais tenham ampliado a sobrevida de muitos pacientes, particularmente em subtipos pediátricos, esses avanços são frequentemente acompanhados por toxicidades sistêmicas severas, que limitam a dose terapêutica, favorecem o surgimento de efeitos tardios e comprometem a qualidade de vida dos pacientes [14].

Nesse contexto, a ocorrência de resistência tumoral, recidiva da doença e efeitos adversos a longo prazo permanece como um desafio clínico relevante, justificando a investigação contínua de novas classes de compostos com mecanismos de ação inovadores, maior seletividade tumoral e menor toxicidade sistêmica [15,16]. Esse cenário fundamenta a busca por abordagens terapêuticas alternativas e modelos experimentais robustos capazes de avaliar, de forma integrada, eficácia antitumoral e segurança toxicológica desde as fases iniciais do desenvolvimento de novos agentes.

1.3 Terapias antineoplásicas e limitações clínicas

Os fármacos antineoplásicos, também denominados citostáticos, são substâncias químicas naturais ou sintéticas empregadas no tratamento de neoplasias quando intervenções como cirurgia ou radioterapia são inviáveis ou insuficientes [17]. Esses agentes podem ser utilizados com finalidade curativa, adjuvante ou paliativa; entretanto, a maioria apresenta elevada toxicidade sistêmica [18].

Do ponto de vista farmacodinâmico, os antineoplásicos podem ser classificados em fármacos ciclo-celular específicos (CCS), que atuam em fases determinadas do ciclo celular, e fármacos não ciclo-celular específicos (CCNS), capazes de agir independentemente da fase de divisão celular [19,20]. Entre as classes clássicas destacam-se os alcaloides da vinca, taxoides, podofilotoxinas, agentes alquilantes e a L-asparaginase, amplamente utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda infantil [21,23].

Apesar dos avanços terapêuticos, muitos desses fármacos estão associados a efeitos adversos graves, incluindo neurotoxicidade, mielossupressão, teratogenicidade e, de maneira

particularmente relevante, cardiotoxicidade [24]. Essas limitações reforçam a necessidade de estratégias terapêuticas que conciliem eficácia antitumoral com redução dos efeitos colaterais sistêmicos.

1.4 Peptídeos bioativos como estratégias terapêuticas inovadoras no câncer

Peptídeos bioativos têm emergido como uma classe promissora de agentes terapêuticos devido à sua elevada especificidade molecular, diversidade estrutural e capacidade de modular vias celulares críticas envolvidas na progressão tumoral [25]. Diferentemente de muitos quimioterápicos convencionais, peptídeos podem ser racionalmente projetados para aumentar a seletividade tumoral e reduzir a toxicidade sistêmica em modelos zebrafish [26].

Os peptídeos anticâncer passaram por aprimoramentos recentes para serem transformados em medicamentos e vacinas, sendo posteriormente avaliados em diferentes fases de ensaios clínicos [77]. Os ACPs são peptídeos bioativos curtos, compostos por 10 a 60 aminoácidos, que exercem seus efeitos terapêuticos por meio de diversos mecanismos que visam especificamente as células cancerígenas, preservando as células normais. Os mecanismos de ação comuns dos peptídeos anticancerígenos incluem indução de apoptose, ruptura da membrana, inibição da angiogênese, modulação de vias de sinalização e imunomodulação (Figura 3). Além disso, os ACPs podem interferir em vias de sinalização essenciais que promovem a sobrevivência, a proliferação e a metástase das células cancerígenas. Esses peptídeos podem ter como alvo proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, na sinalização de fatores de crescimento ou em vias de sobrevivência, levando à inibição do crescimento e da sobrevivência das células cancerígenas [78].

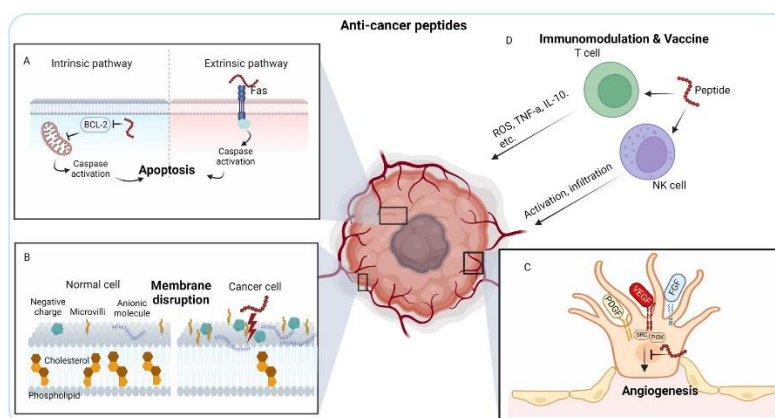


Figura 3. Mecanismos de ação de peptídeos anticancerígenos, destacados para cada mecanismo indicado por caixas e suas respectivas ampliações com esquemas. (A) Indução de apoptose. (B) Ruptura da membrana. (C) Inibição da angiogênese tumoral. (D) Imunomodulação e vacina peptídica. **Fonte:** Nhàn; Yamada; Yamada (2023).

Diversos estudos demonstram o potencial anticancerígeno de peptídeos por meio da indução de apoptose, inibição da proliferação celular, modulação da angiogênese e interferência em vias de sinalização oncogênicas [27,28]. Nesse contexto, os peptídeos avaliados neste estudo (GVL-1, NS2424-TAT e o conjugado (GVL+TAT)) representam abordagens inovadoras, uma vez que foram desenhados com racional molecular voltado à manutenção da atividade biológica associada à redução de efeitos adversos, conforme evidenciado por estudos *in vitro* e em modelos alternativos [29].

1.4.1 Peptídeos escolhidos – TAT, GVL-1 e o conjugado GVL-1 + TAT

Os peptídeos bioativos e compostos contendo grupos guanidínicos têm sido amplamente explorados como plataformas promissoras para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, em virtude de sua elevada capacidade de interação com biomoléculas e superfícies celulares aniônicas. O grupo guanidina apresenta alta basicidade e capacidade de formar múltiplas ligações de hidrogênio, favorecendo interações eletrostáticas estáveis com membranas e alvos intracelulares [112,113]. Essa propriedade estrutural tem sido associada ao desenvolvimento de compostos com potencial farmacológico relevante, particularmente quando se busca modular permeação e atividade intracelular [111].

Entretanto, apesar do potencial bioativo, moléculas contendo grupos guanidínicos podem apresentar limitação relacionada à permeação da membrana plasmática quando administradas isoladamente, uma vez que a carga positiva permanente pode restringir difusão passiva através de bicamadas lipídicas [114]. Nesse contexto, o emprego de cell-penetrating peptides (CPPs) emerge como estratégia consolidada para superar barreiras de internalização celular. CPPs são sequências curtas, geralmente enriquecidas em resíduos básicos, capazes de promover translocação de cargas moleculares através da membrana por mecanismos que envolvem adsorção eletrostática inicial seguida de endocitose ou translocação direta [114,115].

O GVL-1 foi desenvolvido dentro dessa lógica estrutural, integrando características químicas associadas à atividade biológica e potencial interação com sistemas celulares. Entretanto, como observado para diversas moléculas bioativas, a eficiência terapêutica pode ser limitada por barreiras relacionadas à permeação de membrana plasmática e biodisponibilidade intracelular [114].

O peptídeo TAT, derivado da proteína transativadora do HIV-1, constitui um dos CPPs mais estudados e validados como vetor de entrega intracelular. Sua sequência rica em argininas e

lisinas favorece interação com fosfolipídios aniônicos e proteoglicanos de superfície, promovendo internalização eficiente de pequenas moléculas, peptídeos e macromoléculas conjugadas [114–116]. O uso do TAT como “molecular shuttle” tem sido descrito como ferramenta robusta para ampliar biodisponibilidade intracelular e modular comportamento farmacológico de compostos bioativos [115,116].

A estratégia de bioconjugação entre GVL-1 e TAT foi descrita previamente pelo grupo do professor Eduardo Maffudi Cilli (IQ-UNESP) como uma abordagem racional para integrar o potencial bioativo do núcleo guanidínico à capacidade de internalização conferida pelo CPP [111]. Nesse estudo, foi relatada a obtenção do bioconjugado GVL1-TAT por síntese peptídica em fase sólida, seguida de purificação cromatográfica e caracterização estrutural, consolidando sua identidade como organização molecular distinta de seus precursores [111]. A conjugação foi concebida não apenas como estratégia de transporte, mas como meio de remodelar o perfil funcional do composto guanidínico por meio da reorganização espacial de cargas e modulação da interação com membranas biológicas [111,114]. Além disso, análises de estabilidade sérica descritas para o bioconjugado indicaram comportamento compatível com sistema de entrega mediado por CPP, no qual ocorre degradação controlada da porção peptídica e possível disponibilização do núcleo ativo em ambiente celular [111]. Esse padrão é consistente com plataformas baseadas em CPP descritas na literatura como sistemas que conciliam internalização eficiente e posterior liberação funcional do componente bioativo [114,115]. Assim, enquanto GVL-1 representa o núcleo guanidínico funcional e TAT atua como vetor de translocação celular, o bioconjugado GVL-1-TAT constitui uma organização molecular integrada, projetada para explorar simultaneamente interação eletrostática eficiente com membranas e modulação farmacodinâmica por meio de estratégia racional de engenharia peptídica. Além disso, evidências iniciais indicaram que a conjugação ao TAT pode modificar significativamente o perfil funcional do composto, sugerindo um possível ganho de atividade associado à melhoria da internalização celular [111–115]. Tal estratégia é particularmente relevante no contexto do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas baseadas em peptídeos, nas quais o equilíbrio entre atividade biológica e segurança sistêmica constitui fator determinante para viabilidade translacional.

Embora o bioconjugado GVL1-TAT seja descrito na literatura como plataforma de internalização baseada em CPP, os estudos publicados até o momento se concentraram em aplicações anti-infecciosas, sem avaliação específica de cardiotoxicidade ou uso em zebrafish.

No trabalho de referência do composto, os autores reportam ausência de citotoxicidade em macrófagos na maior concentração testada, porém não são apresentados endpoints cardiovasculares, reforçando a lacuna de dados de segurança cardíaca precoce para este sistema [111]. Nesse sentido, a triagem embrio-larval em *Danio rerio* torna-se particularmente relevante como filtro inicial de risco cardiotoxico, considerando a elevada sensibilidade do coração embrionário a moléculas catiônicas e a candidatos terapêuticos bioativos.

1.5 Cardiotoxicidade associada a terapias anticâncer e relevância da avaliação precoce

Apesar dos avanços terapêuticos no tratamento do câncer, a cardiotoxicidade permanece como uma das principais limitações clínicas associadas ao uso de diversos fármacos antineoplásicos. Agentes amplamente utilizados no tratamento de leucemias, como as antraciclinas e determinados inibidores de tirosina-quinase, estão associados a disfunção ventricular, cardiomiopatia dilatada, arritmias e insuficiência cardíaca, que podem se manifestar de forma precoce ou tardia [30–32].

Estudos clínicos indicam que a cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos constitui uma das principais causas de morbidade a longo prazo em sobreviventes de câncer, especialmente em pacientes jovens tratados para leucemia [33–34]. Nesse cenário, o desenvolvimento de compostos que mantenham eficácia antitumoral com menor impacto cardiovascular tornou-se um objetivo central da oncologia translacional [35].

1.6 Limitações do pipeline tradicional de descoberta de fármacos e necessidade de modelos translacionais mais eficientes: Modelos pré-clínicos e gargalos translacionais

O desenvolvimento de novos medicamentos é historicamente um processo longo, custoso e de alto risco que envolve múltiplas etapas, desde a identificação e validação de alvos terapêuticos até testes clínicos de eficácia e segurança. Estudos amplamente citados na literatura estimam que o tempo médio de desenvolvimento de um novo fármaco até o mercado varia entre 10 e 15 anos, e que os custos totais podem exceder US\$ 2 bilhões por composto aprovado [72]. Mesmo com investimentos substanciais em tecnologia, plataformas computacionais e modelos pré-clínicos, a eficiência deste pipeline tem permanecido relativamente estável ao longo das últimas décadas, com taxas de sucesso global ainda baixas, onde análises de grandes conjuntos de dados clínicos demonstram que apenas cerca de 10 % a 15 % dos candidatos a fármacos que entram nos ensaios clínicos são aprovados para uso clínico, representando um alto índice de falhas acumuladas ao longo das fases de desenvolvimento [73–75]. Análises de dados de ensaios

clínicos de 2010 a 2017 mostram quatro possíveis razões atribuídas aos 90% de falhas clínicas no desenvolvimento de medicamentos: falta de eficácia clínica (40%–50%), toxicidade incontrolável (30%), propriedades farmacêuticas ruins (10%–15%) e falta de necessidades comerciais e planejamento estratégico deficiente (10%) [18,73,75]. Como consequência, a indústria farmacêutica tem buscado alternativas e abordagens inovadoras, incluindo a integração de métodos computacionais (*in silico*), ensaios *in vitro* mais representativos e modelos experimentais alternativos intermediários com o zebrafish, que possam reduzir a dependência dos testes convencionais em animais superiores, diminuir custos e aumentar a eficiência preditiva do processo de triagem de compostos.

1.7 Ensaios *in vitro* na triagem inicial de candidatos em pesquisas toxicológicas

A avaliação pré-clínica de novos compostos constitui etapa essencial nas pesquisas toxicológicas e farmacológicas, precedendo a transição para modelos animais e ensaios clínicos. Nesse contexto, os ensaios *in vitro* desempenham papel central na triagem inicial de candidatos, permitindo a análise preliminar de citotoxicidade, bioatividade e mecanismos de ação em sistemas celulares controlados [63].

Modelos baseados em cultura celular são amplamente empregados para investigar viabilidade celular, apoptose, necrose, alterações no ciclo celular, estresse oxidativo e modulação de vias de sinalização molecular, além disso, esses sistemas possibilitam triagens em larga escala (highthroughput screening), o que é particularmente relevante nas fases iniciais do desenvolvimento de compostos bioativos, quando centenas ou milhares de moléculas precisam ser avaliadas de maneira eficiente [63,64].

Do ponto de vista toxicológico, os ensaios *in vitro* contribuem significativamente para a identificação precoce de compostos com perfil citotóxico indesejável, permitindo a exclusão antecipada de candidatos inviáveis e reduzindo custos associados à progressão para modelos mais complexos [65]. Ademais, a utilização de sistemas celulares está alinhada aos princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement), originalmente propostos por Russell e Burch, promovendo a redução do uso de animais em fases iniciais da pesquisa [56,66]. Entretanto, apesar de sua relevância estratégica, modelos *in vitro* apresentam limitações intrínsecas relacionadas à simplificação do sistema biológico, onde culturas celulares bidimensionais tradicionais não reproduzem adequadamente a complexidade do microambiente tecidual, incluindo interações célula–célula, matriz extracelular, gradientes metabólicos e dinâmica

farmacocinética sistêmica, fatores que influenciam diretamente a resposta a agentes terapêuticos [70, 71]

No contexto do desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, ensaios *in vitro* são amplamente utilizados para determinação de parâmetros como IC₅₀, avaliação de seletividade frente a células não tumorais e investigação de mecanismos de morte celular. Contudo, análises retrospectivas indicam que muitos compostos que demonstram atividade promissora em cultura celular falham em etapas posteriores do desenvolvimento, frequentemente devido à baixa correlação entre resultados *in vitro* e desempenho *in vivo*, especialmente no que se refere à farmacocinética, biodisponibilidade e toxicidade sistêmica [63,65]. Dessa forma, embora indispensáveis na triagem inicial de candidatos em pesquisas toxicológicas e farmacológicas, os ensaios *in vitro* não são, isoladamente, suficientes para prever a complexidade das respostas biológicas sistêmicas. Tal limitação fundamenta a necessidade de integração com modelos experimentais intermediários que combinem maior complexidade biológica com viabilidade experimental, ampliando a capacidade preditiva na avaliação pré-clínica.

1.8 Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental em pesquisas toxicológicas

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo de água doce, pertencente à família *Cyprinidae*, amplamente consolidado como modelo experimental em estudos de desenvolvimento, genética, toxicologia e farmacologia [36]. Originário de regiões do Sul da Ásia, esse organismo apresenta características biológicas que o tornam particularmente adequado para pesquisas experimentais, incluindo pequeno tamanho corporal, baixo custo de manutenção, rápido desenvolvimento embrionário e elevada fecundidade [37].

Do ponto de vista reprodutivo, a fertilização externa e a produção de aproximadamente 200 a 300 ovos por desova permitem a obtenção de grandes amostragens experimentais em curto intervalo de tempo [38]. Os embriões apresentam córion translúcido e elevada resistência à manipulação, possibilitando observações morfológicas detalhadas ao longo do desenvolvimento embrionário sem a necessidade de procedimentos invasivos [39].

Geneticamente, o zebrafish apresenta cerca de 70% de homologia gênica com humanos, incluindo a conservação de vias de sinalização críticas envolvidas em processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e angiogênese [40]. Essa similaridade genética sustenta sua ampla aplicabilidade em estudos de doenças humanas, incluindo câncer e distúrbios hematológicos [41].

No contexto oncológico, o zebrafish destaca-se como um modelo pré-clínico altamente versátil, permitindo o monitoramento *in vivo* de eventos fundamentais da progressão tumoral, como crescimento celular, angiogênese tumoral, invasão e metástase [42–44]. A utilização de linhagens transgênicas fluorescentes possibilita a visualização em tempo real de tecidos específicos, vasos sanguíneos e populações celulares, ampliando significativamente a capacidade analítica do modelo [45,49]. Esses sistemas apresentam elevada reprodutibilidade e correlação com modelos murinos e dados clínicos, reforçando o zebrafish como uma ferramenta intermediária entre estudos *in vitro* e modelos animais tradicionais [50].

1.8.1 Avaliação fenotípica de cardiotoxicidade em zebrafish e métodos funcionais de imagem

A toxicidade cardiovascular representa uma das principais limitações no desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, sendo responsável por morbidade significativa e descontinuação terapêutica em pacientes oncológicos [40]. Nesse contexto, o zebrafish (*Danio rerio*) tem sido amplamente empregado como modelo experimental para triagem de cardiotoxicidade, devido à conservação funcional do sistema cardiovascular entre peixes e mamíferos, à transparência embrionária e à rápida formação do coração funcional nas primeiras 24–48 horas pós-fertilização [41]. Diversas vias de sinalização responsáveis pela formação e manutenção do tecido cardíaco apresentam homologia funcional significativa, reforçando a relevância translacional desse modelo para estudos biomédicos e toxicológicos [40,41]. Essas características permitem a avaliação direta e não invasiva de parâmetros fenotípicos cardíacos.

Entre os principais marcadores utilizados para caracterização de cardiotoxicidade em embriões de zebrafish destacam-se alterações na frequência cardíaca (bradicardia ou taquicardia), irregularidades no ritmo, falhas no looping cardíaco, redução da contratilidade ventricular e presença de edema pericárdico [42,43]. O edema pericárdico, em especial, é considerado um biomarcador robusto de disfunção hemodinâmica embrionária, refletindo comprometimento da circulação e da eficiência de bombeamento cardíaco [42].

Estudos demonstram que fármacos com cardiotoxicidade reconhecida em humanos, como doxorubicina e terfenadina, induzem em zebrafish alterações fenotípicas compatíveis com disfunção cardíaca, incluindo redução da frequência cardíaca, distúrbios de condução atrioventricular e edema pericárdico, reforçando a capacidade preditiva translacional do modelo [43,44]. Essa correlação fortalece o uso do zebrafish como ferramenta de triagem pré-

clínica de segurança cardiovascular. Dessa forma, a combinação de análise morfológica (edema pericárdico), funcional (frequência e ritmo cardíaco) e comportamental configura estratégia robusta para identificação precoce de efeitos cardiotoxicos de compostos bioativos, sendo amplamente validada na literatura experimental [41–45].

1.9 Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe (FET) e princípios éticos

A Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) estabelece protocolos internacionalmente reconhecidos para a avaliação de toxicidade de substâncias químicas novas e existentes, visando à padronização metodológica e à reprodutibilidade dos ensaios [51]. Dentre esses protocolos, destaca-se o Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe (Fish Embryo Acute Toxicity Test – FET), descrito na diretriz OECD nº 236 [52].

O FET baseia-se na exposição de embriões recém-fertilizados de zebrafish a diferentes concentrações da substância teste por um período de até 96 horas pós-fertilização, permitindo a avaliação de efeitos letais e subletais durante fases críticas do desenvolvimento embrionário [53]. O ensaio inclui cinco concentrações crescentes do composto, além de controles apropriados, assegurando a robustez estatística dos resultados [52]. Em contextos experimentais de pesquisa, a duração da exposição pode ser estendida para 120 hpf ou mais para permitir a observação de efeitos subletais e teratogênicos adicionais, especialmente quando se busca capturar alterações morfológicas tardias que não se manifestam dentro do período padronizado de 96 hpf.

Durante o período experimental, são avaliados quatro endpoints apicais de letalidade: (i) coagulação dos ovos fertilizados, (ii) ausência de formação de somitos, (iii) falha na separação do pedúnculo caudal do saco vitelino e (iv) ausência de batimentos cardíacos [52–54]. A ocorrência de qualquer um desses critérios é considerada indicativa de morte embrionária, possibilitando o cálculo da concentração letal média (CL_{50}). Além dos endpoints letais, o FET permite a identificação de alterações subletais, incluindo malformações morfológicas, alterações na frequência cardíaca, comprometimento neurológico e atraso no desenvolvimento [55]. Esses parâmetros ampliam significativamente a sensibilidade do ensaio, tornando-o particularmente relevante para a triagem precoce de compostos bioativos com potencial terapêutico.

Do ponto de vista ético, o FET está alinhado aos princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction e Refinement), propostos por Russell e Burch, ao utilizar embriões em estágios iniciais de

desenvolvimento que não são considerados animais protegidos em diversas legislações [56]. Dessa forma, o teste contribui para a redução do uso de peixes juvenis e adultos em estudos toxicológicos, representando uma alternativa eticamente aceitável e cientificamente robusta, assim como a diminuição de animais e do sofrimento animal [29]. A ampla validação do FET para substâncias com diferentes propriedades físico-químicas e modos de ação reforça sua aplicabilidade como ferramenta essencial na avaliação pré-clínica de novos candidatos a fármacos, especialmente quando associada à análise integrada de múltiplos endpoints toxicológicos [30].

1.10 Justificativa

O desenvolvimento de novos compostos com potencial antineoplásico constitui uma das principais frentes de investigação na área biomédica, considerando a elevada incidência global de câncer e as limitações terapêuticas associadas a toxicidade sistêmica, resistência tumoral e efeitos adversos graves decorrentes dos tratamentos atualmente disponíveis. Entretanto, o avanço desses candidatos terapêuticos ao longo do pipeline de desenvolvimento é frequentemente limitado por gargalos relacionados à avaliação de segurança biológica, especialmente nas etapas iniciais de triagem *in vivo*.

Tradicionalmente, a caracterização toxicológica inicial baseia-se em modelos *in vitro*, os quais, embora essenciais para análise de citotoxicidade e mecanismos celulares específicos, apresentam limitações inerentes à ausência de integração sistêmica. Ensaios celulares não reproduzem interações entre tecidos, processos hemodinâmicos, metabolismo integrado ou efeitos multicompartimentais, podendo subestimar ou superestimar perfis de toxicidade. Por outro lado, modelos *in vivo* clássicos baseados em roedores demandam infraestrutura complexa, custos elevados, maior tempo experimental e estão sujeitos a restrições éticas e regulatórias mais rigorosas.

Nesse cenário, o zebrafish (*Danio rerio*) emerge como um modelo vertebrado intermediário que combina complexidade biológica sistêmica com viabilidade experimental, rapidez de resposta e alinhamento aos princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction e Refinement). A utilização de embriões de zebrafish permite a avaliação integrada de parâmetros morfológicos, funcionais e comportamentais em um organismo completo, com menor impacto ético e operacional quando comparado a modelos mamíferos tradicionais. Além disso, sua

transparência embrionária e rápida organogênese possibilitam a detecção precoce de efeitos tóxicos em órgãos-alvo, incluindo o sistema cardiovascular.

No contexto específico deste trabalho, a aplicação do modelo zebrafish não se limitou à caracterização isolada de toxicidade, mas foi incorporada de forma estratégica ao processo de desenvolvimento de compostos inéditos com potencial anticâncer. Considerando que tais moléculas ainda apresentavam escassez de dados na literatura e encontravam-se em estágios iniciais de investigação, tornou-se fundamental estabelecer um sistema experimental capaz de gerar respostas rápidas, confiáveis e biologicamente relevantes para subsidiar decisões estruturais e químicas subsequentes.

A implementação do modelo e do protocolo teste FET adaptado permitiu a realização de testes sucessivos ao longo do processo de modificação estrutural dos compostos, possibilitando avaliação contínua do equilíbrio entre atividade antitumoral e perfil toxicológico. Essa abordagem iterativa favoreceu a identificação de pontos críticos de toxicidade e forneceu subsídios objetivos para redirecionamento experimental, otimização molecular e priorização de candidatos promissores. Dessa forma, o zebrafish atuou como ferramenta decisória dentro do pipeline de desenvolvimento, contribuindo para redução de incertezas e aceleração do processo de refinamento dos compostos.

Adicionalmente, a adoção desse modelo atendeu a demandas práticas relacionadas à ausência de infraestrutura específica para modelos murinos nos grupos colaboradores, limitações orçamentárias e necessidade de obtenção de dados biológicos em tempo hábil para continuidade dos projetos. Assim, o presente trabalho não apenas gerou dados inéditos sobre os compostos investigados, como também estabeleceu um fluxo experimental viável e reprodutível para futuras avaliações toxicológicas no âmbito da colaboração científica. Portanto, a justificativa desta pesquisa fundamenta-se na necessidade de integrar rapidez experimental, relevância biológica e responsabilidade ética na avaliação de novos candidatos antineoplásicos, posicionando o zebrafish como plataforma estratégica para triagem *in vivo* precoce e suporte à tomada de decisão no desenvolvimento racional de compostos terapêuticos e preenchendo as lacunas na avaliação sistemática de bibliotecas de compostos com potencial anticâncer.

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da conjugação do peptídeo GVL-1 ao peptídeo penetrante de célula TAT sobre o perfil toxicológico *in vivo*, utilizando o modelo zebrafish (*Danio rerio*), com o intuito de investigar se a estratégia de conjugação é capaz de modular a toxicidade e aprimorar o potencial biológico do composto.

1.11.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem toxicológica inicial em embriões de zebrafish por meio do Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET), determinando mortalidade e efeitos letais até 120 hpe;
- Avaliar parâmetros subletais, incluindo alterações teratogênicas, edema pericárdico, alterações morfológicas e distúrbios do desenvolvimento embrionário.
- Investigar possíveis efeitos cardiotoxicos por meio da análise de frequência cardíaca, ritmo e alterações estruturais cardíacas;
- Realizar análises morfométricas complementares para quantificação de alterações estruturais subletais;
- Comparar os dados toxicológicos obtidos *in vivo* com os resultados de atividade antitumoral obtidos em ensaios *in vitro* conduzidos pelos grupos colaboradores;
- Selecionar o(s) composto(s) que apresentaram melhor equilíbrio entre baixa toxicidade *in vivo* e manutenção do potencial anticâncer *in vitro*;
- Estabelecer e padronizar um fluxo experimental de triagem toxicológica rápida utilizando zebrafish como ferramenta de suporte à tomada de decisão no desenvolvimento de fármacos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve os procedimentos metodológicos adotados para a execução do presente estudo, incluindo o levantamento bibliográfico que fundamentou a pesquisa e a descrição detalhada da parte experimental. São apresentados os métodos de manutenção e manejo do modelo zebrafish (*Danio rerio*), os procedimentos reprodutivos, os protocolos de exposição aos compostos avaliados, as análises toxicológicas realizadas e os critérios de integração com dados *in vitro* fornecidos por grupos de colaboradores.

REFERÊNCIAS

- 1- Pieters R, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer*. 2011 Jan 15;117(2):238-49. Epub 2010 Sep 7. [[PubMed](#)]
- 2- Avramis VI. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res*. 2012 Jul;32(7):2423-37. PMID: 22753699. [[PubMed](#)]
- 3- Vrooman LM, et al. Postinduction dexamethasone and individualized dosing of Escherichia Coli Lasparaginase each improve outcome of children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: results from a randomized study--Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 20;31(9):1202-10. Epub 2013 Jan 28 [[PubMed](#)].
- 4- Bento, H.B.S., et al. Aliivibrio fischeri L-Asparaginase production by engineered Bacillus subtilis: a potential new biopharmaceutical. *Bioprocess Biosyst Eng* 45, 1635–1644 (2022). [[Link.springer](#)]
- 5- Dos Santos ER, Graminha AE, Schultz MS, Correia I, Selistre-de-Araújo HS, Corrêa RS, Ellena J, Lacerda EPS, Pessoa JC, Batista AA. Cytotoxic activity and structural features of Ru(II)/phosphine/amino acid complexes. *J Inorg Biochem*. 2018 May;182:48-60. [[PubMed](#)]
- 6- Gasser, G., Ott, I., & Metzler-Nolte, N. (2011). Organometallic anticancer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 3–25. [[ASCPublications](#)]
- 7- Clarke, M. J. (2016). Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*, 236(1–2), 209–233. [[ScienceDirected](#)]
- 8- Alessio, E. (2017). Bioinorganic Medicinal Chemistry of Ruthenium Complexes. In: *Metals in Life Sciences Series*. Royal Society of Chemistry. [[MDPI](#)]
- 9- Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. **Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics**. *Trends Pharmacol Sci*. 2017 Apr;38(4):406-424. doi: 10.1016/j.tips.2017.01.003. Epub 2017 Feb 14. PMID: 28209404. [[PubMed](#)]
- 10- BRANNEN, K. C.; PANZICA-KELLY, J. M.; DANBERRY, T. L.; AUGUSTINE-RAUCH, K. A. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, Hoboken, v. 89, n. 1, p. 66-77, 2010. DOI: 10.1002/bdrb.20223.
- 11- GARCIA, G. R.; NOYES, P. D.; TANGUAY, R. L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology & Therapeutics*, Oxford, v. 161, p. 11-21, 2016. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.009.
- 12- HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, Oxford, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005. DOI: 10.1093/toxsci/kfi110.
- 13- KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, Hoboken, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995. DOI: 10.1002/aja.1002030302.
- 14- MACPHAIL, R. C. et al. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 52-58, 2009. DOI: 10.1016/j.neuro.2008.09.011.
- 15- NAGEL, R. DarT: The embryo test with the zebrafish Danio rerio — a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, Konstanz, v. 19, Suppl. 1, p. 38-48, 2002.
- 16- Bashir, S.M., et al. (2022). Chitosan nanoparticles: a versatile platform for biomedical applications. *Materials*, 15(19), 6521. [[MDPI](#)]
- 17- Thambi, T. et al. (2014). Bioreducible Carboxymethyl Dextran Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 3(12), 1829–1838. [[WileyAdvanced](#)]
- 18- XU, Yitian et al. The application of CA72-4 in the diagnosis, prognosis, and treatment of gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1876, n. 2, 188634, dez. 2021. [[Science](#)] 19-