

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Análise comparada dos requisitos regulamentares e científicos não-clínicos
para o registo de novas moléculas no âmbito do Brasil e da ICH**

Raisa Brêda Tôso Sfalsini

Dissertação

Mestrado em Regulação e Avaliação de Medicamentos e Produtos de Saúde

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**FACULDADE DE
FARMÁCIA**
Universidade de Lisboa

**Análise comparada dos requisitos regulamentares e científicos não-clínicos
para o registo de novas moléculas no âmbito do Brasil e da ICH**

Raisa Brêda Tôso Sfalsini

Dissertação orientada pela Prof.^a Doutora Maria Beatriz da Silva Lima

Mestrado em Regulação e Avaliação de Medicamentos e Produtos de Saúde

2013

Resumo

A experiência internacional mostra que a cadeia de inovação da indústria farmacêutica depende de um marco regulatório eficiente para o seu desenvolvimento. Durante os últimos anos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem aperfeiçoando sua legislação regulatória com o objetivo de agregar qualidade, eficiência, segurança e confiabilidade aos estudos não-clínicos desenvolvidos no Brasil, bem como harmonizar sua legislação com os requisitos existentes em *guidelines* de pesquisa não-clínica das Agências Reguladoras internacionais. A aplicação de protocolos devidamente desenvolvidos para a pesquisa não-clínica em instituições de pesquisa e na indústria farmacêutica, de um modo geral, ainda é incipiente, porém durante os últimos anos evidenciou-se um crescente interesse em aperfeiçoar esses estudos, uma vez que existe cada vez mais a necessidade de comprovar e assegurar a rastreabilidade e a confiabilidade dos resultados tanto para aprovação do estudo pela Anvisa como por outras Agências Reguladoras. Há ainda muito a ser feito, e a legislação brasileira necessita ser harmonizada com as *guidelines* internacionais com a finalidade de dar provimento a um adequado estudo não-clínico devidamente desenhado e à possibilidade de permitir a aceitabilidade internacional das decisões tomadas pela Agência Brasileira. Essa revisão apresenta uma análise comparativa entre o guia da Anvisa e as *guidelines* de segurança ICH e europeias referentes aos estudos não-clínicos, além de abordar os principais temas conflitantes. Pretende-se contribuir para uma aproximação dos requisitos não-clínicos suportando ensaios clínicos e processos de autorização de introdução no mercado a nível do Brasil e a nível internacional. (Europa, Estados Unidos, Japão, Canadá)

Palavras-chave: *guidelines* não clínicas, desenvolvimento não clínico, Regulação, Anvisa, ICH.

Abstract

International experience shows that the chain of innovation in the pharmaceutical industry depends on an efficient regulatory framework for its development. During the last years the National Health Surveillance Agency (ANVISA) has been improving its regulatory legislation seeking to aggregate quality, efficiency, safety and reliability to non-clinical studies carried out in Brazil, as well as to harmonize its legislation with the requirements in existing nonclinical research *guidelines* of International Regulatory Agencies. The application protocols developed due to non-clinical studies in research institutions and the pharmaceutical industry, in general, are still in their early stages. However, in recent years an increasing interest in improving these studies has emerged, since there is increasing need to demonstrate and guarantee traceability and reliability of the results for both study approval by ANVISA and by other regulatory agencies. There is still much to be done, and Brazilian legislation needs to be harmonized with the international *guidelines* in order to uphold an adequate non-clinical study designed properly and to allow the international acceptance of drugs developed in the Brazilian environment as well as of the decisions taken by Brazilian Regulatory Bodies. This review presents a comparative analysis between the Anvisa guide and ICH safety *guidelines* relating to European and non-clinical studies, in addition to addressing conflicting key issues. With this work we intended to contribute to a harmonization between the Brazilian requirements to support clinical trials and marketing authorization of human pharmaceuticals with the existing at International level (Europe, United States, Japan, Canada).

Keyword: Nonclinical *guidelines*, Nonclinical development, Regulation, ANVISA, ICH.

Índice

1.	Introdução.....	13
2.	Estudos para Avaliação da Farmacologia	27
3.	Estudos para a Avaliação da Farmacologia de Segurança	28
1.1.	Modelo Animal.....	30
1.2.	Via de Administração.....	31
1.3.	Dosagem	31
1.4.	Metabólitos	32
1.6.	Observações	35
4.	Estudos de Toxicocinética	38
4.1.	Modelo Animal.....	41
4.2.	Via de Administração.....	42
4.3.	Dosagem.....	42
4.4.	Período de Observação.....	43
4.5.	Parâmetros a serem avaliados	43
5.	Estudos de Toxicidade de Dose Única	45
5.1.	Modelo Animal.....	47
5.2.	Via de administração	48
5.3.	Dosagem	48
5.4.	Período de Observação.....	49
5.5.	Parâmetros a serem avaliados	50
6.	Estudos de Toxicidade de Dose Reiterada.....	51
6.1.	Modelo animal	52
6.2.	Via de administração	53
6.3.	Dosagem.....	53
6.4.	Período de observação	54

6.5.	Parâmetros a serem avaliados	57
7.	Estudos de Genotoxicidade	61
7.1.	Testes padrão	62
7.2.	Recomendações – Teste <i>in vitro</i>	66
7.3.	Recomendações – Teste <i>in vivo</i>	70
7.4.	Método para interpretação dos Parâmetros obtidos	76
8.	Estudos de Carcinogenicidade	80
8.1.	Fatores que determinam a necessidade da execução dos estudos de carcinogênese	82
8.2.	Modelo animal	84
8.3.	Via de Administração	86
8.4.	Dosagem	87
8.5.	Período de Observação	89
8.6.	Parâmetros a serem avaliados	89
9.	Estudos de Toxicidade Reprodutiva	92
9.1.	Recomendações gerais	95
9.2.	Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial – implantação	100
9.3.	Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna	103
9.3.4.	Período de Observação	105
9.4.	Desenvolvimento embriofetal	107
9.5.	Interpretação dos dados	110
10.	Estudos nos quais a Descendência é Estudada - Desenvolvimento não-clínico de Medicamentos Pediátricos (estudos em animais juvenis)	115
10.1.	Modelo Animal e duração	118
10.3.	Farmacocinética e toxicocinética	119
10.4.	Dosagem	119
10.5.	Parâmetros a serem avaliados	120
11.	Estudos de Tolerância Local	122

11.1.	Modelo Animal	125
11.2.	Via de administração.....	125
11.3.	Dosagem.....	126
11.4.	Reversibilidade.....	126
11.5.	Bem-estar animal	126
11.6.	Teste de tolerância para vias específicas de administração	127
11.7.	Potencial de Sensibilidade	131
12.	Imunotoxicidade.....	133
12.1.	Propriedades farmacológicas.....	135
12.2.	População alvo.....	136
12.3.	Desenho de estudos de imunotoxicidade adicionais (específicos)	136
13.	Dependência e Tolerância.....	138
14.	Estudos de Fototoxicidade	141
14.1.	Modelo animal.....	146
14.2.	Dosagem.....	149
14.3.	Via de administração.....	150
14.4.	Teste de fototoxicidade <i>in vivo</i> – Administração Tópica.....	151
14.5.	Teste de fototoxicidade <i>in vivo</i> – Administração ocular.....	151
14.6.	Interpretação dos dados	152
15.	Medicamentos Oncológicos.....	154
15.1.	Modelo animal.....	155
15.2.	Duração.....	156
15.3.	Farmacologia e Farmacologia de Segurança.....	156
15.4.	Farmacocinética.....	157
15.5.	Toxicidade Geral	157
15.6.	Toxicidade Reprodutiva	158
15.7.	Genotoxicidade	158

15.8.	Imunotoxicidade	158
15.9.	Fototoxicidade	159
16.	Associações em Dose Fixa	160
16.1.	Modelo animal.....	163
16.2.	Dosagem.....	164
16.3.	Duração.....	164
16.4.	Genotoxicidade	165
16.5.	Carcinogenicidade	165
16.6.	Estudos de toxicidade reprodutiva	165
16.7.	Estudos de farmacologia de segurança	166
17.	Conclusão.....	168
18.	Anexo I	171
	Bibliografia.....	202

Índice de Figura

Figura 1: Curva de valor da indústria farmacêutica.	16
Figura 2: Processo de desenvolvimento de novos medicamentos – Adaptação	19
Figura 3: Diagrama de representação do CTD	22
Figura 4: Diagrama de representação da Petição de Registro – ANVISA	23
Figura 5: Estratégias de ensaios não-clínicos do sistema cardiovascular.....	33
Figura 6: A ligação entre farmacocinética e farmacodinâmica.	39
Figura 7: Princípios básicos na escolha dos testes de carcinogenicidade	85
Figura 8: Representação período de administração do fármaco teste - sacrifici	112
Figura 9: Diagrama de tomada de decisão sobre contra indicação em mulheres grávidas.	114
Figura 10: Diagrama de recomendação para avaliação Imunotóxic.....	134
Figura 11: Tomada de decisão para estudo não-clínico de potencial de dependênci.....	140
Figura 12: Avaliação de fototoxicidade de novos produto	145

Índice de tabelas

Tabela 1: <i>Guidelines</i> ICH e europeias destinadas à pesquisa não-clínica.....	20
Tabela 2: Período de observação - Brasil.....	55
Tabela 3: Período de observação – Europa/EUA/Japão	55
Tabela 4: Período de observação – Europa/EUA/Japão	56
Tabela 5: Anexo I	59

Lista de Siglas

3R	<i>Refinement, Reduction and Replacement</i>
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
Ames	<i>Bacteria Reversed Mutation Assay</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva de concentração versus tempo
BPL	Boas Práticas Laboratoriais
C _{max}	Concentração máxima
C _{tempo}	Concentração em um tempo específico após a administração da dose
CTD	<i>Common Technical Document</i>
DL50	Dose Letal 50%
EEC	<i>European Economic Community</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLP	<i>Good Laboratory Practice (Boas Práticas de Laboratório)</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ICT	Instituições de Ciência e Tecnologia
I&D	Investimento e Desenvolvimento
IWGT	<i>International Workshops on Genotoxicity Testing</i>
LLNA	<i>Local Lymph Node Assay</i>
MDT	Máxima Dose Tolerada
MEST	<i>Mouse Ear Swelling Test</i>
MFD	<i>Maximum Feasible Dose</i>
MLA	<i>Mouse Lymph Node Assay</i>

NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NOAEL	<i>No Observable Adverse Effect Level</i>
NOEL	<i>No Observable Effect Level</i>
NRU-PT	<i>Neutral Red Uptake Phototoxicity Test</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PD	Farmacodinâmica
PIP	Plano de Investigação Pediátrico
PK	Farmacocinética
RGT	<i>Relative Total Growth</i>
RLV	Receita Líquida de Venda
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TDAR	<i>T- Dependent Antigen Response</i>
UDS	<i>Unscheduled DNA Synthesis</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Introdução

Nas últimas duas décadas, a indústria farmacêutica tem experimentado grande transformação, houve grande avanço científico com potencial para revolucionar diagnósticos e tratamentos em seres humanos. O avanço tecnológico e a automação incrementaram eficiência nos laboratórios, mas a produtividade da indústria, como um todo, não atingiu as altas expectativas da sociedade. Com a perda de patentes farmacêuticas de seus principais produtos a indústria tem recorrido à pesquisa em áreas onde há um nicho farmacêutico pouco explorado (Han et al. 2010).

Apesar do crescimento observado, a atual década experimentou um processo produtivo consideravelmente menor, apesar de apresentar números maiores em investimento em Pesquisa e Desenvolvimento (I&D) e avanços na investigação de potenciais novas moléculas. Esta queda pode ser relacionada a dois dos principais problemas enfrentados pela indústria, a falta de eficácia do novo candidato e/ou aparecimento de reações adversas inesperadas que levam ao abandono da pesquisa (Gad 2008).

Atualmente, a indústria farmacêutica pode ser considerada como um dos setores mais inovadores da economia, devido os elevados investimentos requeridos pela Pesquisa e Desenvolvimento (I&D) de novos medicamentos, tornando-se um dos principais fatores de competitividade nesse setor, a qual está focada na diferenciação de produtos por meio da inovação. Além disso, a reorganização industrial é comum neste setor, onde procuram aumentar a participação da terceirização das etapas de descoberta e desenvolvimento de diversas atividades, tendo como objetivos a minimização de gastos com infraestrutura e a maximização da flexibilidade financeira (Pieroni et al. 2009; Han et al. 2010).

O tema inovação está ganhando um espaço importante tanto na agenda pública como na estratégia da indústria brasileira. À semelhança do Brasil, esse processo também pode ser observado em alguns outros países emergentes como a Índia e a China. Existe uma significativa correlação entre o nível de investimento de

um país em inovação com o grau de exposição e de inserção de suas empresas no mercado internacional. A abertura de novos mercados e a capacidade de ampliar participação em mercados já consolidados dão à inovação uma posição estratégica na concorrência entre as empresas (Sennes 2009)

Inovar constitui o principal fator de sobrevivência para as empresas farmacêuticas que operam no mercado. Além disso, tal processo enfrenta grande pressão tanto pelos pacientes como pelas agências reguladoras e comissões éticas, que visam inserir no mercado medicamentos eficazes e seguros, e, juntamente com a indústria buscam opções que reduzam os custos. Apesar dos desafios enfrentados, os pesquisadores necessitam antecipar, o mais cedo possível, através de estudos não-clínicos iniciais o provável perfil ativo da nova molécula, tornando o processo mais produtivo e eficiente, evitando grandes gastos desnecessários com moléculas que poderão vir a falhar mais tarde no processo (Han et al. 2010; Kumar & Longstreth 2011).

A produção farmacêutica nacional até a promulgação da lei brasileira de patentes, em 1996, esteve focada na produção de cópias de medicamentos existentes (medicamentos similares) no mercado mundial, incluindo medicamentos sob patente ativas, sendo essa a base da competição e lucro nacional. Após esse marco, as empresas foram impedidas de comercializar os medicamentos similares de fármacos com patentes vigentes, passando assim a buscar alternativas para a sua produção com a finalidade de manter-se no mercado. Sendo assim, após esse período a indústria farmacêutica brasileira passou a encarar a I&D como uma estratégia importante para a sustentação e ampliação de sua participação no mercado (Pieroni et al. 2009).

Entretanto ainda não houve um crescimento substancial nesta área, a presença alta tecnológico nos produtos exportados pelo Brasil ainda pode ser considerada modesta, sendo uma clara indicação da necessidade de adoção de políticas públicas para estimular as empresas brasileiras a investir mais em inovação, de forma a aumentar o valor agregado dos produtos e serviços que oferecem nos mercados interno e externo. Além das políticas adotadas, outro desafio é a geração de recursos humanos especializado (Pieroni et al. 2009).

Durante o desenvolvimento de um novo medicamento é necessário avaliar e prever em laboratório a sua segurança e eficácia, antes que possa ser testado em humanos. São necessários testes em animais (*in vitro* e *in vivo*), informação computacional e conhecimento teórico para dar suporte aos ensaios clínicos e, conseqüentemente, a solicitação do registro do novo fármaco. Embora os estudos não-clínicos sejam responsáveis apenas por 10% de todo o investimento realizado no desenvolvimento do fármaco, a sua realização é de vital importância uma vez que condiciona o desenho dos estudos de todos os outros ciclos de pesquisa envolvendo a fase mais crítica do desenvolvimento – fase clínica – a nível econômico (Kumar & Longstreth 2011).

Embora a estratégia industrial farmacêutica esteja focada na diferenciação por meio de inovações, o Brasil passou a focar principalmente a sua produção em medicamentos genéricos, constituindo um segmento de mercado baseado, sobretudo, em custos. Entretanto o processo de produção dos medicamentos genéricos possibilitou ao Brasil a agregação de novos conhecimentos tecnológicos de produção, derivados da obrigatoriedade de comprovação de bioequivalência (testes de intercambialidade) entre o medicamento registrado e o genérico. Com esses novos conhecimentos a indústria farmacêutica brasileira aponta para uma intensificação em I&D especialmente relacionados a inovações incrementais. (Pieroni et al. 2009).

Ao pesquisar processos alternativos, as empresas adquirem novos conhecimentos tecnológicos possibilitando o desenvolvimento de processos mais eficientes que as tornam mais competitivas, podendo mesmo contribuir para o melhoramento ou descoberta de novos usos de moléculas conhecidas. Com mais recursos disponíveis as maiores empresas brasileiras iniciaram um movimento mais efetivo de I&D de novos medicamentos ou de novos usos de moléculas conhecidas. Porém, a investigação através de testes não-clínicos não ganhou grande visibilidade como o esperado (Han et al. 2010).

A expansão para um mercado global acontece mediante inovações tecnológicas que lhes deem sustentação financeira (Figura 1). Empreendimentos em inovação geram custos elevados além de agregar grandes incertezas e riscos. Como descrito, as empresas no Brasil mantêm-se nos mercados domésticos através

de venda de cópias o que gera uma baixa margem de lucro, sendo insuficiente para estabelecerem-se no mercado global altamente competitivo. Como pode ser visto na Figura 1 o investimento em inovações tecnológica é compensado pela alta margem de lucro para a empresa investidora, conseqüentemente a tomada de decisão em investir em I&D por companhias brasileiras é um ponto crítico o qual poderá determinar o futuro da empresa (Vieira & Ohayon 2006).

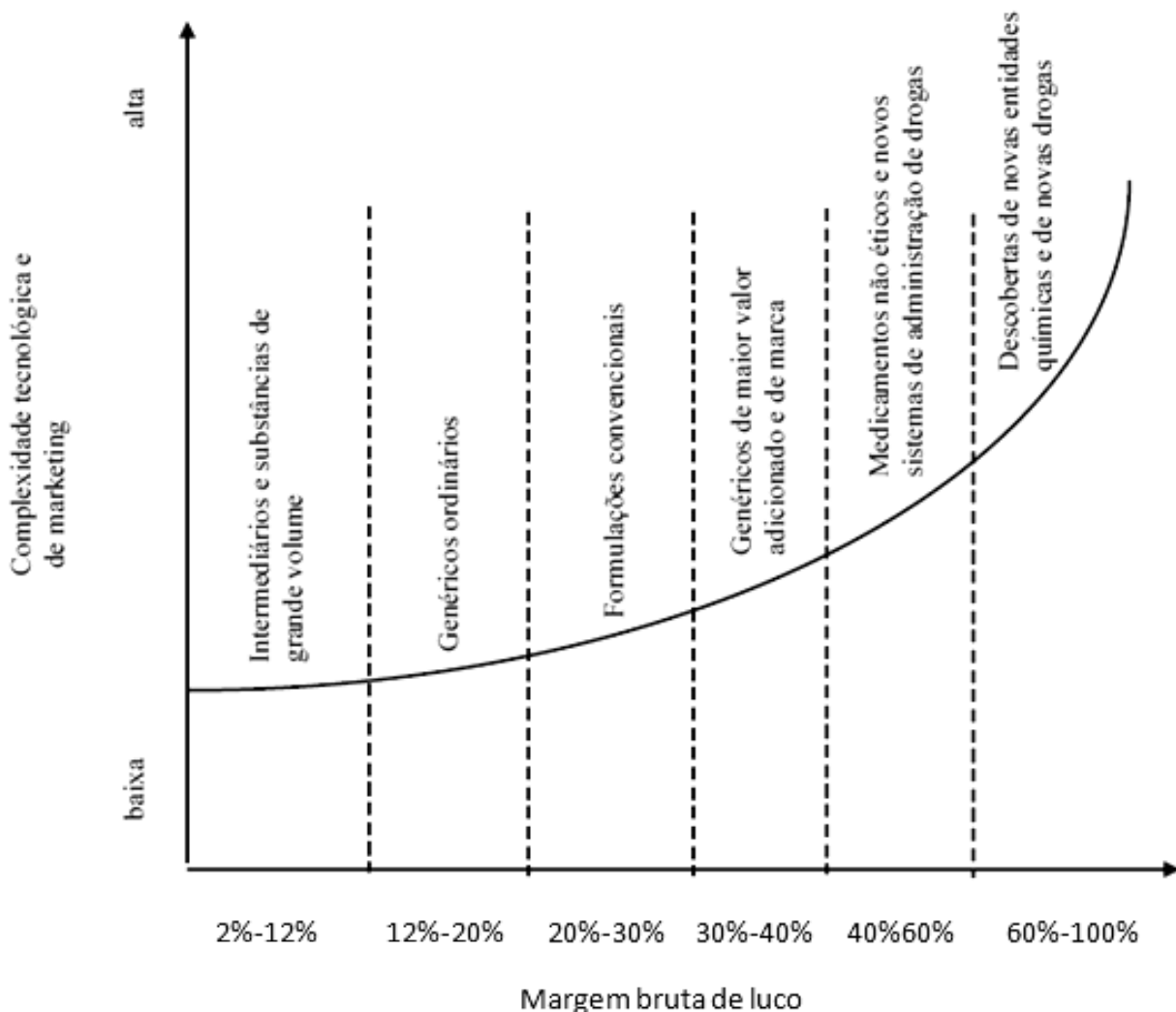


Figura 1: Curva de valor da indústria farmacêutica (Vieira & Ohayon 2006).

O Brasil encontra-se entre os países de estágio industrial evolutivo II, que são aqueles que possuem razoável capacidade industrial em química fina, produzindo as matérias-primas necessárias. Um dos principais motivos para o baixo nível de inovação brasileiro é o reduzido volume de recursos destinados a essas atividades.

As empresas brasileiras investem cerca de 0,86% das suas receitas líquidas de vendas (RLV) em I&D; 0,34% em projeto industrial e outras preparações técnicas; e 0,23% na introdução de inovações no mercado. A única atividade que recebe mais de 1% da RLV das empresas é aquisição de máquinas e equipamentos (1,31%) Sendo assim, cabe principalmente ao setor acadêmico (Instituto Oswaldo Cruz e universidades federais) e setor público o desenvolvimento das atividades de I&D (Vieira & Ohayon 2006; Sennes 2009).

O desenvolvimento de um produto farmacêutico é um processo extremamente complexo, longo e caro que envolve a avaliação de eficácia e segurança em animais (*in vitro* e *in vivo*) e humanos. Os objetivos da avaliação de segurança dos estudos não-clínicos geralmente incluem uma caracterização dos efeitos tóxicos em relação ao órgão alvo, dose resposta, relação de exposição (dose – efeito) e, quando apropriado, potencial de reversibilidade. A determinação da dose inicial (primeira dose) recomendada em humanos é determinada tendo em consideração a dose-resposta farmacológica e o perfil farmacológico/toxicológico. Estes estudos permitem ainda estimar as doses eficazes para os testes clínicos, e os parâmetros a monitorar, de acordo com os efeitos observados na fase não-clínica em relação a potenciais efeitos adversos (International Conference on Harmonisation 2009a).

Os ensaios não-clínicos, como o nome sugere, ocorrem antes de se iniciar os ensaios clínicos em humanos, mas também podem ser uma ferramenta para comprovar efeitos evidenciados em humanos durante os ensaios clínicos. São fundamentais para a produção de conhecimento acerca de resultados analíticos de mensuração da molécula e seus metabólitos nos fluidos corporais, formulação de dosagem apropriada para humanos, aspectos farmacológicos e toxicológicos em animais com o objetivo de extrapolação para humanos (Gad 2008).

O processo de pesquisa não-clínica está confinado a grandes empresas multinacionais pois sua estrutura facilita o desenvolvimento e a internalização dos conhecimentos, possibilitando a capitalização dos lucros e administração mais eficiente das incertezas envolvidas na geração de inovações. No Brasil, em função das dificuldades descritas, as indústrias possuem maior interesse em terceirizar essa etapa de pesquisa (Radaelli et al. 2009).

A terceirização corresponde em dividir o programa não-clínico em porções onde o patrocinador pode realizar alguns estudos internamente e outros são realizados por empresas parceiras, o que pode limitar o risco geral dos estudos em termos de custo e tempo. Entretanto, essa distribuição do trabalho agrega sua própria quota de risco (Kumar & Longstreth 2011).

Os elevados gastos nos estudos não-clínicos derivam do elevado nível de investimento em equipamentos e mão-de-obra especializada. Tais testes são requeridos pelas agências reguladoras para comprovação da eficácia e segurança de novos fármacos antes de serem testadas em humanos. Os testes de farmacodinâmica/farmacocinética possuem uma relação custo-efetivo positivo, além de um processo robusto que garante um entendimento completo dos efeitos desejados e dos efeitos adversos de uma nova entidade química em animais e humanos. Esse achado é crítico para compreender os estudos toxicológicos em animais bem como para orientar tomadas de decisões, isto é, iniciar os ensaios clínicos (Pieroni et al. 2009; Han et al. 2010).

Para fins regulatórios internacionais, os testes não-clínicos devem ser conduzidos segundo os princípios da Boa Prática Laboratorial (BPL), de forma que os resultados dos testes realizados em diferentes países tenham qualidade comparável e sejam aceitos entre si. A realização desses testes em condições de BPL é critério eliminatório, mostrando a importância desse conjunto de regras para avaliação com qualidade da segurança e da eficácia dos novos medicamentos. O objetivo das regras BPL é garantir qualidade e rastreabilidade dos resultados da pesquisa (Fraga 2011).

A acreditação BPL é condição necessária, mas não suficiente, para a aprovação dos ensaios não-clínicos. Para submetê-los às agências reguladoras internacionais, é necessário também seguir normas internacionais que indicam, para cada tipo de ensaio, os testes toxicológicos exigidos para comprovação da segurança dos medicamentos, com objetivo de padronizar as pesquisas realizadas. Estes protocolos são conhecidos como *guidelines* (Pieroni et al. 2009).

O primeiro grande marco no desenvolvimento de um novo fármaco é a determinação da primeira dose em humanos. Há um grande interesse no avanço de uma nova terapêutica, levando em consideração principalmente o potencial risco,

avaliados nos estudos não-clínicos. Uma vez concluídos os estudos clínicos de fase I, inicia-se a comparação da exposição humana com a exposição em animais, que dará suporte a previsão da exposição humana em estudos clínicos subsequentes e ao cálculo das reais margens de segurança do novo fármaco (Cavagnaro 2008).

Como descrito, os testes não-clínicos são de extrema importância para dar suporte aos testes clínicos e posteriormente a comercialização do medicamento. Como pode ser visto abaixo (International Conference on Harmonisation 2009a):

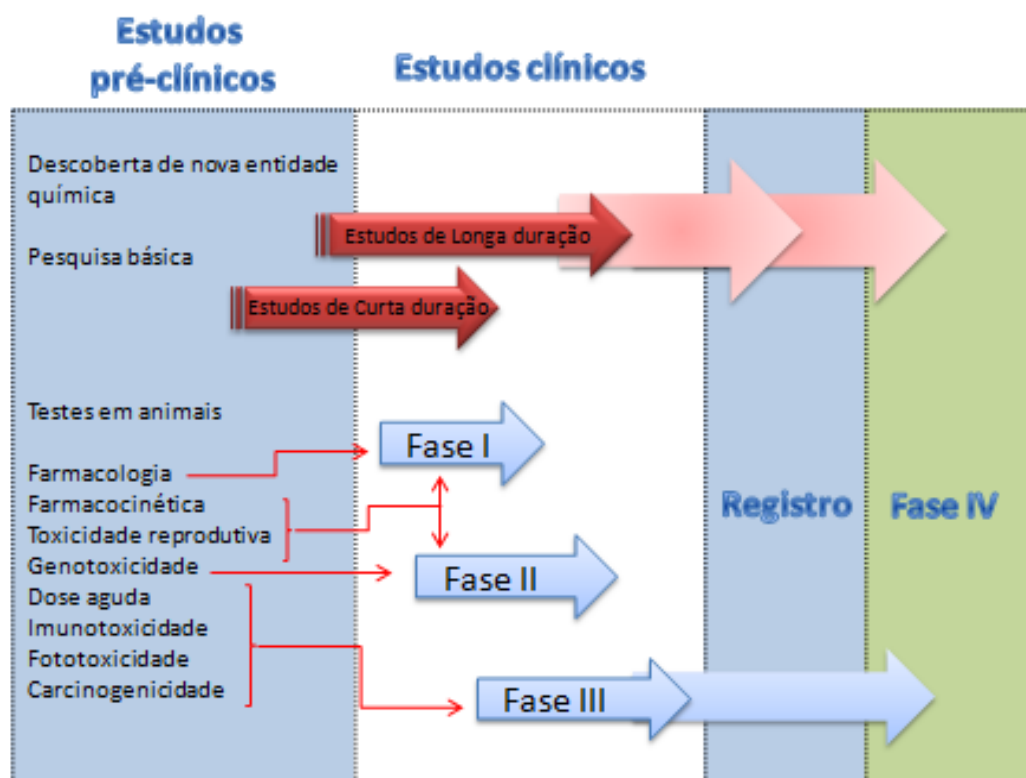


Figura 2: Processo de desenvolvimento de novos medicamentos – Adaptação (Food and Drug Administration 2012)

Diversos documentos de orientação estão disponibilizados pela *Food and Drug Administration* (FDA), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OCDE), *European Medicines Agency* (EMA) e pela *International Conference on Harmonization* (ICH), para auxiliar na escolha e concepção dos estudos não-clínicos (Kumar & Longstreth 2011).

As *guidelines* publicadas pela ICH são as mais utilizadas globalmente, não possuem caráter obrigatório mas são documentos amplamente recomendados pelas agências reguladoras internacionais. A ICH foi formada no início da década de 90 sendo composta por membros das agências reguladoras e representantes da indústria farmacêutica da Europa, Japão e Estados Unidos. Foi acordado que os temas harmonizados entre esses países seriam documentos ligados a Qualidade, Segurança e Eficácia para refletir os três critérios que são base para a aprovação e autorização de novos medicamentos (International Conference on Harmonisation 2012a).

Atualmente as *guidelines* ICH que orientam os estudos não-clínicos são a ICH M3-R2 (assuntos gerais) e as *guidelines* de Segurança (assuntos específicos). Uma vez que as *guidelines* específicas encontram-se na seção Segurança, a sua intitulação inicia com a letra S seguida de um numeral, o qual determina a ordem cronológica em que são aprovadas pela ICH. Além das *guidelines* ICH, algumas *guidelines* da EMA também são adotadas, como podem ser visualizadas na tabela 1 (International Conference on Harmonisation 2012e; European Medicines Agency 2012):

Tabela 1: *Guidelines* ICH e europeias destinadas à pesquisa não-clínica

Área	Guideline
Carcinogenicidade	S1A – Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals
	S1B - Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals
	S1C (R2) - Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals
Genotoxicidade	S2 (R1) - Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use
Toxicocinética	S3A - Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies

Farmacocinética	S3B - Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies
Dose reiterada	S4 - Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (rodent and non rodent toxicity testing) CPMP/SWP/1042/99 (R1) - <i>Guideline</i> on Repeated Dose Toxicity (EMA)
Toxicidade Reprodutiva	S5 (R2) - Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility (em revisão)
Biotechológicos	S6 (R1) - Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals
Farmacologia	S7A - Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7B - The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (qt interval prolongation) by Human Pharmaceuticals
Imunotoxicologia	S8 - Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals
Oncológicos	S9 - Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals
Fototoxicidade	S10 - Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals (Step 2) CPMP/SWP/398/01 - Note for Guidance on Photosafety Testing (EMA)

(International Conference on Harmonisation 2012e)

Um ponto importante a ser observado entre os países harmonizados pela ICH (EUA, Europa e Japão) é a implementação de uniformização dos processos e documentos (CTD - *Common Technical Document*) de registro de medicamentos. Nas regiões ICH a organização documental deve estar de acordo com a *guidelines M4 - Organisation of the Common Technical Document for the Registration of*

Pharmaceuticals for Human Use. A disposição das informações deve estar de forma clara e não ambígua, a fim de facilitar a revisão dos dados. Com essa decisão foi eliminada a necessidade de reformatação dos dados para submissão de registro em diferentes agências regulatórias integrantes da ICH. O documento CTD está dividido em 5 módulos (Figura 3) (International Conference on Harmonisation 2004):

- Módulo 1 – Informações administrativas regionais e de prescrição;
- Módulo 2 – Sumário do CTD;
- Módulo 3 – Informações de qualidade;
- Módulo 4 – Dados dos estudos não-clínicos;
- Módulo 5 – Dados dos estudos clínicos.

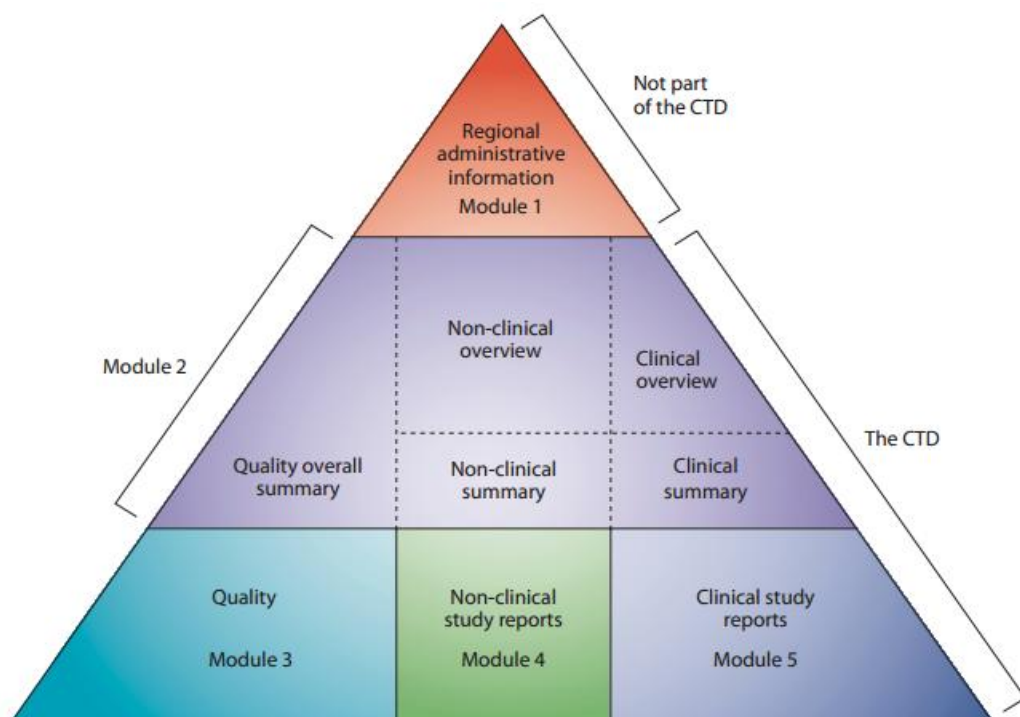


Figura 3: Diagrama de representação do CTD (International Conference on Harmonisation 2012d)

No Brasil a organização documental é dividida em 3 partes: análise farmacotécnica, composta por parte documental (legal) e relatório técnico; análise de eficácia; e análise de segurança, os quais englobam os relatórios dos estudos não-clínicos e clínicos (Figura 4). A análise farmacotécnica é realizada por técnicos da

própria Anvisa, porém as análises de eficácia e segurança ainda dependem da análise de consultores externos, organizados em câmaras técnicas, e são realizadas paralelamente à análise dos técnicos da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2012a).



Figura 4: Diagrama de representação da Petição de Registro – ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2012a)

Em geral os estudos não-clínicos solicitados pelas agências reguladoras, tanto brasileira como internacionais cobrem a farmacologia e farmacocinética (ADME) em animais e a farmacologia de segurança. Os estudos toxicológicos incluem a toxicidade aguda, toxicidade por administração reiterada, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, carcinogenicidade e tolerância local, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica. Outros estudos que avaliam a segurança do fármaco poderão ser necessários conforme o caso (International Conference on Harmonisation 2012e; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Para além desses estudos em comum com o Brasil, a ICH possui ainda *guidelines* para os estudos não-clínicos para população pediátrica, registro acelerado de medicamentos antineoplásicos e medicamentos biológicos. A publicação de novas *guidelines* ICH e internacionais e as revisões constante dos

documentos já existentes aumentam a solicitação de testes não-clínicos, em número e complexidade, e conseqüentemente o custo e tempo (International Conference on Harmonisation 2012e; Kumar & Longstreth 2011).

No CTD os resultados dos ensaios não clínicos devem estar contidos no módulo 4 e sua organização deve seguir a *guideline* ICH M4S-R2 - *Nonclinical Summaries and Organisation of Module 4*. No Brasil os ensaios não-clínicos devem estar contidos no item 2.c do dossiê de registro, conforme a legislação RDC nº 136 de 2003 - Dispõe sobre registro de medicamentos novos e organizados conforme o guia de estudo não-clínicos brasileiro (International Conference on Harmonisation 2002; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2003; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

CTD – ICH

Índice Módulo 4 (4.1)

Relatório dos Estudos (4.2)

Farmacologia (item 4.2.1)

Farmacologia primária (4.2.1.1)

Farmacologia Secundária (4.2.1.2)

Farmacologia de Segurança (4.2.1.3)

Interações farmacodinâmicas (4.2.1.4)

Farmacocinética (4.2.2)

Métodos analíticos e Relatório de validações (4.2.2.1)

Absorção (4.2.2.2)

Distribuição (4.2.2.3)

Metabolismo (4.2.2.4)

Excreção (4.2.2.5)

Interações farmacocinéticas (4.2.2.6)

Outros estudos (4.2.2.7)

Estudos Toxicológicos (4.2.3)

Estudos de Dose Única (4.2.3.1)

Estudos de Dose Reiterada (4.2.3.2)

Genotoxicidade (4.2.3.3)

Carcinogenicidade (4.2.3.4)

Anvisa

Check list – Registro de Medicamento Novo (2.c)

Estudos de Dose Única (2.c.1)

Estudos Doses Repetidas (2.c.2)

Estudos de Toxicidade Reprodutiva (2.c.3)

Estudos de Genotoxicidade (2.c.4)

Estudos de Tolerância Local (2.c.5)

Estudos de Carcinogenicidade (2.c.6)

Farmacologia de Segurança (2.c.7)

Estudos de Toxicocinética (2.c.8)

Associação em Dose Fixa (2.c.9)

Toxicidade Reprodutiva (4.2.3.5)

Tolerância Local (4.2.3.6)

Outros Estudos Toxicológicos (4.2.3.7)

Antigenicidade (4.2.3.7.1)

Imunotoxicidade (4.2.3.7.2)

Estudos mecanicistas (4.2.3.7.3)

Dependência (4.2.3.7.4)

Metabólitos (4.2.3.7.5)

Impurezas (4.2.3.7.6)

Outros (4.2.3.7.7)

No Brasil, ainda é necessário constituir um marco regulatório para os testes não-clínicos e que os atualize de acordo com os requisitos ICH, se pretende uma verdadeira internacionalização no desenvolvimento de medicamentos. Como forma de iniciar a regulação desta matéria a Anvisa publicou em 2010 um guia para a condução dos testes não-clínicos de segurança com o objetivo de disponibilizar e sinalizar para o mercado os princípios que irão ser adotados pela Agência. Com a evolução desta atividade no país, estas orientações irão ser gradualmente convertidas em exigências (Pieroni et al. 2009).

O guia brasileiro está baseado em documentos publicados por agências de regulação amplamente reconhecidas no cenário mundial (*Food and Drug Administration - FDA, European Medicines Agency - EMA*), e de instituições de interesse na área (*International Conference on Harmonisation - ICH, Organization for Economic Co-operation and Development - OECD, National Cancer Institute - NCI, World Health Organization - WHO*). O objetivo é uma maior harmonização com a regulamentação internacional e cientificamente válida. Além também de racionalizar estudos não clínicos, evitando duplicações e utilização desnecessária de animais sem que isso possa comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança dos fármacos em desenvolvimento (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010b).

Como a atividade de desenvolvimento de medicamentos é nascente, também a regulação deste tema no Brasil está em processo de elaboração. A Anvisa ainda não exige, em legislação, Boas Práticas de Laboratório dos testes conduzidos no

país, porém o guia recentemente elaborado orienta que os testes devam ser realizados seguindo a BPL (Pieroni et al. 2009).

Com o objetivo de fomentar maior interesse da indústria em I&D, o governo brasileiro passou a criar ferramentas de discussão sobre políticas públicas e mecanismos de financiamento à inovação em foros governamentais. Mas somente recentemente é que passou a ser considerado como prioritário nas políticas industriais do governo, tornando-se relevante em diversos programas governamentais a promoção da inovação (Vieira & Ohayon 2006).

Com o guia brasileiro pretende-se que os estudos não-clínicos necessários ao desenvolvimento de novos medicamentos em andamento no Brasil sejam realizados de forma harmonizada e cientificamente válida, com geração de documentos aceitos tanto no Brasil quanto por agências reguladoras de outros países. Além disso, espera-se que eles possam fornecer dados confiáveis para dar subsídios às futuras pesquisas clínicas. Trata-se de uma tendência internacional que traz benefícios em termos de rastreabilidade e segurança dos dados gerados (Pieroni et al. 2009; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A Anvisa caminha em direção à harmonização com as legislações internacionais, concedendo um período de adaptação da indústria brasileira. Os avanços estão ocorrendo, de forma concomitante, entre as empresas farmacêuticas, os prestadores de serviço não-clínico (terceirização) e os órgãos regulatórios (Pieroni et al. 2009).

O presente trabalho tem por objetivo a realização de uma análise comparativa entre os requisitos regulamentares e científicos não-clínicos para o registro de novas moléculas químicas no âmbito da ICH e o guia elaborado pela Anvisa – Brasil, discutidas mais detalhada no decorrer do trabalho e resumida nas tabelas do anexo I. Propõe também soluções para os itens não coincidentes que poderão ser identificados durante a análise. A regulamentação dos medicamentos biológicos não é abordada nesse trabalho.

2. Estudos para Avaliação da Farmacologia

Os estudos de farmacologia podem ser divididos em três categorias: farmacodinâmica primária; farmacodinâmica secundária; e estudos farmacológicos de segurança (International Conference on Harmonisation 2001).

Os estudos primários de farmacodinâmica (*in vivo* ou *in vitro*) são necessários para investigar o mecanismo de ação e os efeitos provocados pelo composto em relação ao efeito desejado no alvo terapêutico. Esses estudos contribuem para a seleção de dose nos estudos não clínicos e clínicos. Já os estudos secundários de farmacodinâmica investigam o mecanismo de ação e os efeitos provocados por um composto não relacionados ao alvo terapêutico estudado (International Conference on Harmonisation 2009a).

Tais estudos são geralmente conduzidos durante a fase de descoberta de desenvolvimento farmacêutico e, como tal, não são geralmente realizadas de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) (International Conference on Harmonisation 2009a).

Os testes de farmacodinâmica, primário e secundário, farmacologia de segurança (ICH S7A e S7B) e os de farmacocinética (ICH S3A e S3B) são indispensáveis para a seleção da(s) espécie(s) mais relevante(s), bem como determinar o desenho e as doses mais indicadas para os estudos não-clínicos (International Conference on Harmonisation 1994b; International Conference on Harmonisation 2001).

3. Estudos para a Avaliação da Farmacologia de Segurança

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S7A - Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals

ICH S7B - The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals

Anvisa – Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

A primeira *guideline* publicada pela ICH sobre os estudos de segurança farmacológica data de 2001, intitulando-se ICH S7A - *Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals*. Esse documento encontra-se vigente até o presente momento (International Conference on Harmonisation 2001).

Em 2005, com a finalidade de complementar as informações do estudo acerca dos testes cardiovasculares, foi publicada a *guidelines* ICH S7B - *The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT interval prolongation) by Human Pharmaceuticals* (International Conference on Harmonisation 2005b).

Os estudos de farmacologia podem ser divididos em três categorias: farmacodinâmica primária; farmacodinâmica secundária; e estudos farmacológicos de segurança (International Conference on Harmonisation 2001).

Os estudos primários de farmacodinâmica (*in vivo* ou *in vitro*) são necessários para investigar o mecanismo de ação e os efeitos provocados pelo composto em relação ao efeito desejado no alvo terapêutico. Esses estudos contribuem para a seleção de dose nos estudos não clínicos e clínicos. Já os estudos secundários de farmacodinâmica investigam o mecanismo de ação e os efeitos provocados por um

composto não relacionados ao alvo terapêutico estudado (International Conference on Harmonisation 2009a).

O estudo de farmacologia de segurança é definido como análise dos potenciais efeitos farmacodinâmicos de uma substância nas funções fisiológicas indispensáveis à vida, em relação a exposição no intervalo terapêutico. E seus objetivos são (International Conference on Harmonisation 2001):

- Identificar propriedades farmacodinâmicas indesejáveis que tenham relevância para a segurança humana;
- Avaliar efeitos adversos farmacodinâmicos e/ou fisiopatológicos observados em estudos clínicos ou toxicológicos;
- Investigar o mecanismo de ação dos efeitos farmacodinâmicos adversos.

A relação de estudos de farmacologia de segurança inclui a avaliação de efeitos no sistema cardiovascular, sistema nervoso central e sistema respiratório, e geralmente são realizados antes da exposição humana ao composto. Quando necessário, dados adicionais e acompanhamento de testes de farmacologia de segurança podem ser conduzidos nos estudos clínicos (International Conference on Harmonisation 2009a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

É também possível considerar a inclusão de alguns estudos *in vivo* aos estudos de toxicidade geral, a medida do possível, a fim de reduzir o uso de animais (International Conference on Harmonisation 2009a).

Quando necessário, deve-se também avaliar o sistema renal, nervoso autônomo, gastrintestinal e ainda função endócrina, imune e os músculos esqueléticos (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013)

A escolha do desenho do estudo dependerá dos conhecimentos prévios acerca do composto. Sendo assim alguns fatores devem ser observados (International Conference on Harmonisation 2001):

- Efeitos anteriormente relatados na mesma classe terapêutica do composto em estudo, uma vez que o mecanismo de ação possa sugerir efeitos adversos específicos;

- Efeitos adversos associados a membros da mesma classe química ou terapêutica;
- Interação com o ligante ou dados de ensaios enzimáticos que possam sugerir potenciais efeitos adversos;
- Resultados prévios de estudos de farmacologia de segurança, a partir dos estudos secundários de farmacodinâmica, ou a partir de dados de uso em humanos.

1.1. Modelo Animal

Segundo a Anvisa (2013), o modelo animal a ser seguido será:

“Sistema nervoso central - A escolha da espécie para a condução de estudos de segurança farmacológica do SNC deve ser justificada com base na suscetibilidade, sensibilidade, reprodutibilidade, disponibilidade de dados comparativos históricos, ou seja, de sua relevância para a obtenção de dados e a extrapolação das conclusões para seres humanos.”

Sistema Cardiovascular

In vitro - Preparações celulares e de tecidos para ensaios *in vitro* são obtidos de diferentes espécies animais incluindo: coelho, furão, cobaia, cão, suíno e ocasionalmente humano. O mecanismo iônico de repolarização em ratos e camundongos adultos difere de grande número de espécies, incluindo o homem. Portanto, a utilização de tecidos dessas espécies não é considerada adequada.

In vivo - Cão, macaco, furão, suíno, coelho, cobaia. O mecanismo iônico de repolarização em ratos e camundongos adultos difere de grande número de espécies, incluindo o homem. Portanto, a utilização dessas espécies também não é considerada adequada nos testes *in vivo*.

Os mesmos dados podem ser encontrados nas *guidelines* ICH.

Adicionalmente, a ICH S7A descreve que os modelos usados nos estudos de farmacologia de segurança podem ser tanto *in vitro* como *in vivo*. Os estudos *in vitro* podem utilizar para os ensaios: preparações de órgãos e tecidos, cultura de células, fragmento de células, organelas celulares, recetores, canais iônicos, transportadores ou enzimáticos. Os estudos *in vitro* devem ser desenhados para estabelecer a relação efeito – concentração. Os estudos *in vivo* devem preferencialmente usar animais não anestesiados, estes ensaios devem ser desenhados para definir a relação dose resposta dos efeitos tóxicos observados. O tempo de início e duração

da resposta dos efeitos tóxicos devem ser investigados. (International Conference on Harmonisation 2001).

1.2. Via de Administração

A mesma via a ser administrada em humanos, quando possível (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Porém, segundo a *guidelines* ICH S7A a avaliação dos efeitos por mais de uma via de administração poderá ser realizada se o composto teste for indicado com várias vias de administração em humanos (i.e. oral e parenteral), ou onde for observada antecipadamente diferenças qualitativas e quantitativas na exposição sistêmica ou local (International Conference on Harmonisation 2001).

1.3. Dosagem

Segundo a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

“São geralmente realizados com administração única. A duração deve ser baseada em critérios racionalmente elaborados:

- Quando efeitos farmacodinâmicos ocorrem somente depois de certo período de tratamento, ou;
- Quando resultam de estudos não clínicos de doses-repetidas, ou;
- Quando resultados da utilização em humanos levam ao aumento de interesse sobre os efeitos na segurança farmacológica.”

Na *guideline* ICH S7A o regime descrito é similar ao proposto pela Anvisa. Além dessas informações esta *guidelines* ainda acrescenta novas informações (International Conference on Harmonisation 2001).

As doses que provocam os efeitos tóxicos devem ser equiparáveis com a dose necessária para provocar o efeito primário farmacodinâmico na espécie alvo ou o efeito terapêutico em seres humanos. Caso não sejam observados efeitos adversos com a dose terapêutica, a dose escolhida para os testes é a que produzir efeitos adversos moderados na espécie alvo (International Conference on Harmonisation 2001).

As concentrações utilizadas no estudo devem ser selecionadas visando o aumento da probabilidade em detetar efeitos adversos no sistema teste. O limite superior pode ser influenciado pelas propriedades físico-químicas da substância teste ou outros fatores determinantes. Na ausência de efeitos adversos a escolha das doses devem ser justificadas (International Conference on Harmonisation 2001).

1.4. Metabólitos

De acordo com o Anvisa (2013):

“A avaliação dos metabólitos maiores é frequentemente obtida nos estudos em animais do composto principal. Se um ou mais metabólitos importantes para humanos estiverem ausentes ou forem produzidos em quantidades reduzidas nos animais, estudos específicos de segurança farmacológica para esse(s) metabólito(s) devem ser considerados.

Geralmente, qualquer composto que origine metabólitos ativos que alcancem exposição sistêmica relevante devem ser avaliados nos estudos de farmacologia de segurança. Os estudos de segurança só são realizados com isómeros quando o composto for uma mistura isomérica. Formulações finais de medicamentos só devem ser estudadas quando estas alteram substancialmente a atividade farmacocinética/farmacodinâmica da substância ativa em comparação com a formulação previamente testada (International Conference on Harmonisation 2001).

1.5. Estudos de farmacologia de segurança

Os estudos de farmacologia de segurança são divididos em (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Farmacologia de segurança em sistema cardiovascular;
- Farmacologia de segurança em sistema nervoso central;
- Farmacologia de segurança em sistema respiratório.

1.5.1. Sistema Cardiovascular

Para avaliação do sistema cardiovascular devem ser estimadas: pressão sanguínea; frequência cardíaca; eletrocardiograma; e também contração ventricular, resistência vascular, efeitos endógenos e/ou exógenos de substâncias na resposta cardíaca. Avaliações *in vivo*, *in vitro* e/ou *ex vivo*, incluem métodos para repolarização e anomalias de condução. Para avaliação do prolongamento da repolarização ventricular pode-se utilizar o ensaio I_{Kr} (*in vitro*) e o ensaio QT (*in vivo*) (Figura 6) (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

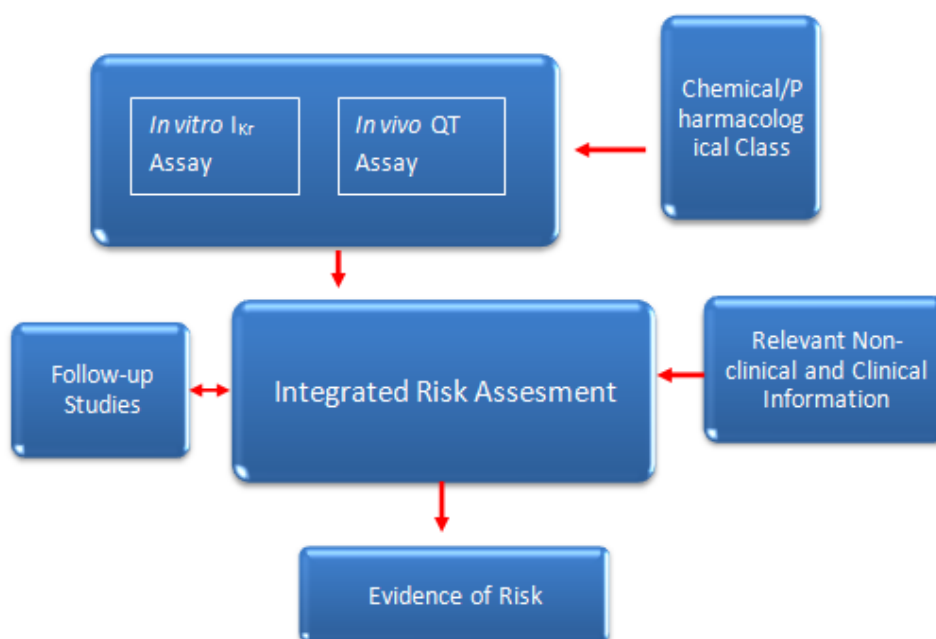


Figura 5: Estratégias de ensaios não-clínicos do sistema cardiovascular (International Conference on Harmonisation 2005b).

A duração da repolarização ventricular, ação potencial cardíaco, depende de uma série de canais iônicos transmembranares que são altamente interdependentes, e seu funcionamento é afetado por inúmeros fatores, dentre esses fármacos e potenciais fármacos. A repolarização ventricular pode ser dividida em 5 fases (International Conference on Harmonisation 2005b):

1. Fase 0: influxo de Na^+ através dos canais de Na^+ ;
2. Fase 1: início da repolarização através da inativação dos canais de Na^+ e início do efluxo de K^+ pelos canais de K^+ ;

- a. Fase 2: fase de platô, onde há equilíbrio entre o influxo de Ca^+ e o efluxo de K^+ ;
- b. Fase 3: repolarização, completo efluxo de K^+ (I_{kr} e I_{ks});
- c. Fase 4: potencial de repouso.

A alteração da repolarização ventricular pode ser resultado da diminuição na inativação dos canais de Ca^+ e Na^+ , no aumento da ativação dos canais de Ca^+ ou inibição dos canais de K^+ . Com o intuito de analisar essa alteração os estudos não-clínicos sobre repolarização ventricular são divididos em estudos *in vitro*, ensaios I_{kr} , e os estudos *in vivo*, ensaios QT (International Conference on Harmonisation 2005b).

Os ensaios I_{kr} avaliam os efeitos de um diferencial de potencial elétrico através dos canais iônicos de potássio transmembranares (canais I_{kr}) nativos ou expressados nas células estudadas. Esses estudos avaliam os potenciais mecanismos celulares que não estão devidamente evidenciados nos estudos *in vivo*. Os ensaios I_{kr} podem ser realizados em células ou tecidos (preparações multicelulares). Células isoladas podem ser consideradas um sistema frágil, já o preparado multicelular é considerado mais estável e indicado para a realização desse estudo (International Conference on Harmonisation 2005b).

A repolarização do músculo cardíaco pode ser modulado por inúmeros canais iônicos, porém o canal iônico de potássio (I_{kr}) foi especificamente escolhido para os testes *in vitro* por ser o canal mais comum envolvido na prolongação do intervalo QT em humanos (International Conference on Harmonisation 2005b).

O intervalo de QT do eletrocardiograma é parâmetro mais utilizado para avaliar a substância teste em relação à repolarização ventricular. Outros parâmetros de interesse a serem avaliados podem incluir: pressão sanguínea; batimentos cardíacos; Intervalo PR; Duração QRS; e arritmias (International Conference on Harmonisation 2005b; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Segundo a *guidelines* ICH S7A os parâmetros a serem analisados são: pressão sanguínea; frequência cardíaca; e eletrocardiograma. Também deve ser considerado a inclusão de métodos para avaliar anormalidades de repolarização e condução (International Conference on Harmonisation 2001).

O estudo eletrofisiológico *in vitro* pode explorar potenciais mecanismos celulares que podem não estar evidenciados nos dados obtidos nos estudos *in vivo*, complementando assim os dados gerados. A *guideline* S7B também propõe métodos para estudo *in vitro* do potencial para alterar a despolarização/repolarização ventricular, como fator preditivo do potencial prolongamento do intervalo QT e arritmogenicidade ventricular (torsades de pointe) (International Conference on Harmonisation 2005b).

1.5.2. Sistema nervoso central

Segundo o guia da Anvisa (2013) os parâmetros que devem ser avaliados são:

“Efeitos da substância no sistema nervoso central devem ser avaliados apropriadamente. Observar: atividade motora, modificações comportamentais, coordenação, respostas reflexas sensório-motoras e temperatura corporal. Por exemplo, a bateria de observação funcional (FOB), o teste de Irwin modificado ou outro protocolo experimental apropriado podem ser utilizados.”

O mesmo pode ser observado na *guideline* ICH S7A (2001b).

1.5.3. Sistema respiratório

Os efeitos sobre o sistema respiratório devem ser avaliados com base na frequência respiratória e outras medidas respiratórias (como volume de ar inalado e exalado por respiração e avaliação da saturação da hemoglobina). Para avaliação do sistema respiratório, observações clínicas não são geralmente adequadas, mas sim a quantificação dos parâmetros supracitados por metodologia adequada (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

1.6. Observações

Quando, com base na classe química ou nas propriedades farmacológicas da substância em teste, emergirem preocupações relativas à potencial ocorrência de efeitos adversos associados à farmacologia durante os ensaios clínicos ou nos estudos de farmacovigilância poderá ser necessária a avaliação adicional com estudos complementares, decididos caso a caso, indicados abaixo (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013)

- Sistema Respiratório: avaliações de resistência de vias aéreas, pressão arterial pulmonar, pH sanguíneo, gasometria;
- Sistema Cardiovascular: avaliações de débito cardíaco, contratilidade ventricular, resistência vascular, efeitos de substâncias endógenas e/ou exógenas sobre as respostas cardiovasculares;
- Sistema Nervoso Central: avaliações de farmacologia comportamental, aprendizado e memória, exames visuais, auditivos, ligantes específicos, neuroquímica e/ou eletrofisiologia;
- Sistema Gastrointestinal: avaliações de secreção gástrica, potencial prejuízo gastrointestinal, secreção biliar, tempo de trânsito *in vivo*, contração ileal *in vitro*, pH gástrico;
- Sistema Renal/Urinário: avaliações de volume urinário, gravidade específica, osmolalidade, pH, fluidos/balanço eletrolítico, proteínas, citologia, hemácias, bem como determinações químicas de ureia, creatinina, proteínas plasmáticas;
- Sistema Nervoso Autônomo: avaliações de ligações à recetores relevantes para o sistema nervoso autônomo, respostas funcionais para agonistas ou antagonistas *in vivo* ou *in vitro*, estimulação direta dos nervos autônomo e medição das respostas cardiovasculares e variabilidade do ritmo cardíaco;
- Outros Sistemas: avaliações de musculatura esquelética, funções imunes e endócrinas.

Existem situações, abaixo identificadas, para os quais os estudos de farmacologia de segurança não são considerados necessários (International Conference on Harmonisation 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Testes de substâncias de uso tópico (por exemplo, cutânea ou ocular), onde a farmacologia da substância testada está bem caracterizada, e onde a exposição sistêmica ou a distribuição para outros órgãos ou tecidos é considerada baixa;
- Em casos de agentes citotóxicos administrados em pacientes vítimas de câncer em estágio terminal. No entanto, para agentes citotóxicos com novo mecanismo de ação, pode haver necessidade da condução de estudos de segurança farmacológica;
- Testes de produtos biotecnológicos que são altamente específicos para seu recetor alvo, muitas vezes é suficiente avaliar a segurança farmacológica como parte dos parâmetros de toxicologia e/ou estudos farmacodinâmicos. Assim, os estudos individualizados de segurança farmacológica podem ser reduzidos ou suprimidos para estes produtos. Entretanto, para os produtos biotecnológicos que representam uma nova classe terapêutica e/ou os produtos não recetor-específicos, uma avaliação mais extensa da segurança farmacológica deve ser considerada;
- Pode haver outras condições para as quais os estudos de segurança farmacológica sejam dispensáveis, por exemplo, novos sais com similaridades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

4. Estudos de Toxicocinética

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S3A - Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies

ICH S3B - Guidance for repeated dose tissue distribution studies

Anvisa - Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

As *guidelines* relativas aos estudos da farmacocinética e toxicocinética situam-se entre as primeiras *guidelines* publicadas pela ICH, datando de 1994, intitulado-se, ICH S3A - *Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies* e ICH S3B - *Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies*. Tais *guidelines* permanecem vigentes até os dias atuais, e são fundamentais para o planejamento e apoio aos estudos toxicológicos solicitados nas outras *guidelines* publicadas pela ICH (International Conference on Harmonisation 1994a; International Conference on Harmonisation 1994b).

Um conhecimento abrangente sobre absorção, distribuição, metabolização e eliminação (ADME) de um novo composto é necessário para o planejamento e a interpretação dos estudos farmacológicos e toxicológicos. Os estudos de distribuição tecidual são essenciais para fornecer informações sobre a distribuição e o acúmulo do composto e seus metabólitos, especialmente em relação aos potenciais sítios de ação. Essas informações podem ser úteis para o desenho dos estudos futuros e para interpretação dos seus resultados (International Conference on Harmonisation 1994b).

A farmacocinética engloba os processos que estão relacionados com a ação do organismo sobre o fármaco (Figura 5). Estes testes permitem promover a

avaliação da relação da concentração da molécula nos fluidos corporais com o efeito produzido. Tais dados são também fundamentais para a seleção das espécies animais a utilizar nos estudos não-clínicos e para a interpretação destes (Han et al. 2010).

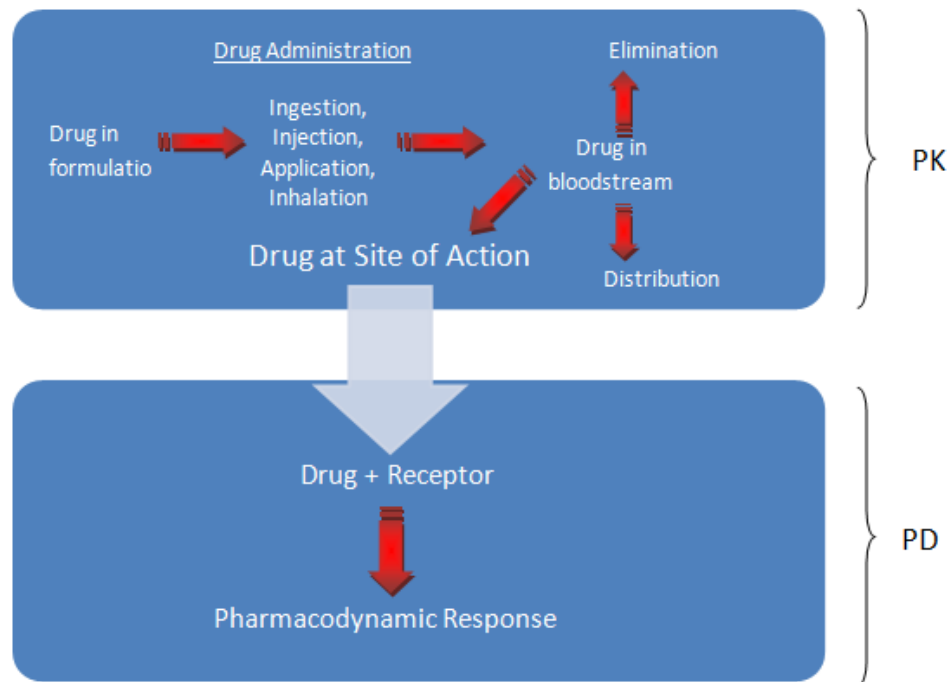


Figura 6: A ligação entre farmacocinética e farmacodinâmica (Han et al. 2010).

Toxicocinética é definida como um componente integral na condução de estudos de toxicidade não-clínicos, com a finalidade de avaliar a exposição sistêmica dos animais ao composto teste. Os dados obtidos nos estudos cinéticos e toxicocinéticos são utilizados na interpretação de achados toxicológicos e na avaliação de sua relevância para a segurança clínica (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A toxicocinética tem como objetivo primário a descrição da exposição sistêmica obtida em animais e a sua relação com o nível de dose e o tempo. Como objetivos secundários pode-se considerar: exposição obtida em estudos de toxicidade e sua relevância para a segurança clínica; suporte à escolha de espécies e regimes de tratamento em estudos de toxicidade não clínica; e o fornecimento de informações que contribuam para o desenho de estudos não-clínicos de toxicidade

subsequentes (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Para a seleção das espécies a utilizar nos estudos toxicológicos é necessário conhecer as vias de metabolização humana determinadas *in vitro* e a farmacocinética em múltiplas espécies de animais. As espécies selecionadas deverão ter um perfil farmacocinético similar ao previsto para humanos, assim como deverão responder fármaco de forma semelhante (similaridade farmacocinética e farmacodinâmica) (International Conference on Harmonisation 2009a).

As diferenças entre espécies tais como ligação às proteínas plasmáticas, absorção tecidual, propriedades do recetor alvo e o perfil de metabolização devem ser demonstradas durante o estudo. A avaliação do perfil de metabolização é de extrema importância, pois sua atividade farmacológica pode derivar quer do fármaco quer dos metabólitos (International Conference on Harmonisation 2009a).

Informações sobre farmacocinética nas espécies de animais selecionadas e informações bioquímicas relevantes *in vitro* (humanos e animais) para potenciais interações medicamentosas devem ser avaliados antes de expor o composto a um amplo número de pacientes (estudos clínicos Fase III). Esses dados podem também ser usados para comparar os metabólitos humanos e animais e determinar a necessidade de realizar testes adicionais (International Conference on Harmonisation 2009a).

O processo de metabolização descreve a biotransformação da entidade química. A pesquisa nesta área envolve a identificação, caracterização estrutural, quantificação, exame e determinação dos sistemas enzimáticos envolvidos. A taxa de metabolismo em grande parte pode afetar a concentração eventual do fármaco, o que irá determinar e seus possíveis efeitos biológicos (Han et al. 2010).

Em algumas situações pode ser necessário estudar o perfil toxicológico dos metabolitos. Citam-se entre estas (International Conference on Harmonisation 1994a; International Conference on Harmonisation 2009a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Quando o princípio ativo é uma pró-fármaco;

- Quando o composto é biotransformado em metabólitos farmacológico ou toxicológico ativos;
- Quando o princípio ativo é amplamente metabolizado e sua mensuração só é possível através da mensuração do seu metabólito principal;
- Situação de metabólitos específicos do humano;
- Situação de metabólito(s) *major* definidos como ativos e ocorrendo em concentração igual ou superior a 10% da observada com o fármaco original.

Alguns metabólitos não apresentam risco toxicológico (conjugados de glutatona), dessa forma testes toxicológicos específicos não são expressamente necessários. A necessidade de caracterização não-clínica de um metabólito fonte de preocupação no estudo deve ser considerada caso-a-caso (International Conference on Harmonisation 2009a).

A quantificação da exposição sistêmica fornece uma avaliação da concentração do composto na espécie alvo e auxilia na interpretação das semelhanças e diferenças de toxicidade entre espécies, sexo e regimes de doses. A exposição ao composto pode ser mensurada através da concentração no plasma (soro ou sangue total) ou através de gráficos AUCs (área sobre a curva de concentração vs tempo) do princípio ativo/metabólito (International Conference on Harmonisation 1994a).

No planejamento de um estudo de toxicidade a escolha das doses a utilizar deverá ter em consideração a relação dose/resposta sistêmica a atingir nos animais, relativamente à que é projetada para a utilização clínica. Os estudos de toxicocinética irão avaliar a exposição dos animais nas diferentes doses utilizadas e permitirão comparação entre espécie a partir do perfil cinético e dinâmico, auxiliando na determinação das margens de segurança relativamente aos efeitos toxicológicos observados (International Conference on Harmonisation 1994a).

4.1. Modelo Animal

A exposição sistêmica em um estudo toxicológico (dose reiterada; genotoxicidade; carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva) deve ser estimada em um número apropriado de animais que garanta uma base adequada para a avaliação do risco associado. O número de animais a ser utilizado deve ser o mínimo consistente com a produção adequada de dados de toxicocinética. Estes estudos podem ser realizados tanto em todos como em uma parte representativa dos animais utilizados no estudo principal ou em grupos satélite. Em estudos com animais de grande porte as amostras para toxicocinética podem ser coletadas dos animais do estudo principal. Grupos satélite podem ser necessários para as espécies menores (roedores). Quando machos e fêmeas são utilizados no estudo, normalmente é estimada a exposição em animais de ambos os sexos (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

4.2. Via de Administração

Segundo o guia da Anvisa a via de administração deve ser similar àquelas preconizadas para uso humano, quando possível (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A *guidelines* ICH S3A vai mais além, indica também o uso de via similar ao pretendido para humanos, entretanto vias de administração alternativas podem ser consideradas nos estudos de toxicocinética, e a escolha deverá estar baseada nas propriedades farmacocinéticas do composto (International Conference on Harmonisation 1994a).

4.3. Dosagem

São escolhidas geralmente três concentrações para os testes: dose baixa, intermediária e alta (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

- Dose baixa: dose sem efeito tóxico;
- Dose média: deve normalmente representar um múltiplo apropriado entre a dose baixa e alta;
- Dose alta: normalmente determinada por considerações toxicológicas.

Segundo a Anvisa (2013), os tempos de colheita de amostras devem ser tão frequentes quanto necessário, sem interferir com a condução normal do estudo ou causar *stress* fisiológico desnecessário aos animais. Em cada estudo, o número de colheitas de amostras deve ser justificado.

A justificativa para escolha do número de colheitas deve estar baseada nos dados cinéticos obtidos em estudos de toxicidade anteriores; estudos pilotos; estudos distintos em modelo animal, ou em outros modelos que possibilitem a extrapolação (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Diferentemente da Anvisa a ICH S3A geralmente especifica que são realizadas de 4 a 8 colheitas de amostras durante o intervalo da dose para realizar a estimativa de C_{max} , C_{tempo} (concentração em um tempo específico após a administração da dose) e a curva concentração x tempo (AUC) (International Conference on Harmonisation 1994a).

4.4. Período de Observação

O período suficiente para avaliar a toxicocinética do fármaco no modelo animal estudado (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

4.5. Parâmetros a serem avaliados

A quantificação da exposição sistêmica mais vulgarmente utilizada é a representação da concentração plasmática (soro ou sangue) ou a área sob a curva em função do tempo (AUC), onde está também representado o pico de

concentração máximo (C_{max}). Em alguns casos parâmetros como excreções urinárias podem ser mais apropriadas para algumas substâncias teste (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Parâmetros cinéticos, como por exemplo, pico de concentração plasmática, AUC (área sob a curva concentração da substância X tempo) associados a informações sobre a Máxima Dose Tolerada (MDT) em animais utilizados para estudos não-clínicos, auxiliam na definição das doses a serem administradas durante a Fase 1 da Pesquisa Clínica (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

5. Estudos de Toxicidade de Dose Única

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S4 - Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing)

CPMP/SWP/1042/99 (R1)- *Guideline* on Repeated Dose Toxicity

Anvisa - Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

Uma etapa importante, para garantir a segurança de futuros medicamentos, é a realização de testes toxicológicos em modelos animais adequados. O estudo toxicológico de dose aguda é um dos testes que pode integrar uma bateria de análises a serem realizados dentro do estudo não-clínico (Robinson et al. 2009).

Historicamente, informações sobre dose aguda foram obtidas através de estudos de dose única, visando a obtenção de efeitos tóxicos agudos após a administração única do medicamento teste. A dose pode ser administrada uma única vez ou pode ser dividida em mais doses, mas a administração não pode exceder 24 horas. O período de observação dos efeitos causados pela administração, geralmente, é de 14 dias. O objetivo deste estudo é a determinação de doses letais e a identificação dos mecanismos que estão envolvidos na morte causada pela substância teste (International Conference on Harmonisation 2009a; European Medicines Agency 2010b; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

As informações obtidas a partir dos estudos de toxicidade aguda também podem ser obtidas através de outros estudos. Tais estudos podem ser desenvolvidos a partir de escalonamento da dose com diferentes concentrações ou estudos de pequena duração com variação na concentração da dose, e com esses dados poderá ser definida a Máxima Dose Tolerada (MDT) para os testes

toxicológicos futuros. Quando for possível obter a informação sobre toxicidade aguda a partir de qualquer outra fonte tal estudo é desnecessário. De acordo com as *guidelines* publicados pela ICH, a letalidade não é um objetivo (*endpoint*) do estudo de toxicidade aguda o que diverge do atual guia brasileiro, como pode ser visto abaixo (International Conference on Harmonisation 2009a).

“Estes estudos devem ser realizados anteriormente à Fase I da Pesquisa Clínica. Estudos para a determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) não são necessários. Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD.”

No ano de 2010, através de análise e discussões na *Safety Working Party do Committee for Medicinal Products for Human Use – CHMP*, foi decidido que, de acordo com as decisões tomadas na guideline ICH M3-R2, a *guideline* europeia sobre estudo de dose única seria revogado. Para preencher tal lacuna foi instituído que as *guidelines* M3-R2 e EMA/CHMP/SWP/81714/2010 (*Guideline* para Dose Reiterada - revista) passariam a regulamentar tal assunto (European Medicines Agency 2010b).

Esta decisão foi baseada principalmente no reconhecimento de que os dados obtidos nos tradicionais estudos toxicológicos de dose única são de valor limitado e os dados sobre a toxicidade aguda podem ser obtidos através de outros estudos. Tal como referido na ICH M3-R2, em muitos casos, os dados de toxicidade aguda podem ser obtidos apropriadamente em estudos de dose reiterada, onde há variação de dose. Esses dados também podem ser obtidos através de estudos não GLP (*Good Laboratory Practices*). Uma outra forma de obter informações sobre a toxicidade aguda é através da sua incorporação nos estudos de farmacologia de segurança conduzidos de acordo com as *guidelines* ICH (European Medicines Agency 2010b).

Essa tomada de decisão vem ao encontro da necessidade da avaliação do bem-estar animal, e visa a redução ou o refinamento dos estudos com animais levando em consideração as diretrizes dos 3R (*refinement, reduction and replacement* – refinamento, redução e substituição) atualmente adotado pelas agências reguladoras Americana e Européia. Espera-se a utilização mínima possível de animais sem que isso comprometa os objetivos do estudo, e a segurança dos

doentes, e que o método empregado na pesquisa elimine ou reduza ao mínimo qualquer possibilidade de dor, sofrimento, aflição ou dano duradouro aos animais (European Parliament and of the Council 2010; European Medicines Agency 2010b).

Porém, existem algumas situações específicas em que os estudos de toxicidade de dose única são necessários sendo o único suporte para o estabelecimento da segurança de seu uso em humanos. Estas incluem ensaios clínicos exploratórios para o desenvolvimento dentro de certas áreas terapêuticas, tais como produtos para oncologia. Esses estudos também podem ser realizados para fornecer uma compreensão mecanística de um determinado dado toxicológico extremo. Nestes casos, estudo normalmente é desenhado com esse propósito. No entanto, a informação obtida é considerada de valor muito limitado para prever as consequências de uma sobredosagem em seres humanos (European Medicines Agency 2010b).

Os estudos de dose única podem ser o suporte primário para estudos em humanos. Informações sobre toxicidade aguda do medicamento teste podem ser úteis para identificar e avaliar possíveis reações quando ingerido em excesso, e desta forma auxiliar os estudos clínicos de fase III. Uma avaliação primária da toxicidade aguda pode ser importante para algumas indicações terapêuticas em que a população exposta corra o risco de sobredosagem, acidental ou intencional, como é o caso de medicamentos indicados para depressão, dor, doenças degenerativas do sistema nervoso (International Conference on Harmonisation 2009a).

5.1. Modelo Animal

Conforme o guia da Anvisa (2013), os estudos de toxicidade aguda devem ser conduzidos no mínimo em duas espécies de mamíferos.

Porém mais algumas informações devem ser observadas conforme a *guideline* CPMP/SWP/1042/99-R1 (European Medicines Agency 2010a).

Deve-se usar números iguais de machos e fêmeas, duas espécies de mamíferos sendo um não-roedora. O número de animais por grupo de dose deve ser suficiente para permitir uma interpretação científica adequada dos dados gerados no

estudo, e para detetar diferenças em relação aos grupos de controlo, respeitando os princípios éticos do bem-estar animal. É necessário determinar previamente as variáveis a serem estudadas nas espécies, bem como as estirpes utilizadas. Em caso de sacrifício durante o estudo, a dimensão dos grupos de tratamento deve ser suficiente para não interferir na análise estatística final. Quando são incluídos grupos de recuperação, o planeamento da dimensão dos grupos deve atender-se a que no final do estudo, alguns animais serão usados para os testes de reversibilidade de efeitos tóxicos, e que essas alterações possam ser avaliadas corretamente. No entanto deve evitar-se a utilização de um número excessivo de animais, seguindo a regra dos 3Rs (European Medicines Agency 2010a).

5.2. Via de administração

Segundo o guia da ANVISA (2013):

“Utilizar duas vias de administração:

(1) a pretendida para administração em humanos e;

(2) a parenteral. Se a administração endovenosa for a pretendida para uso em humanos, a utilização de apenas esta via para estudos de toxicidade de dose única é suficiente. Quando a via pretendida para uso em humanos for a oral, é recomendável a administração do produto em animais por gavagem.”

Segundo a *guideline* CPMP/SWP/1042/99-R1 (2010a), em geral a via de administração deverá ser a mesma que serão utilizadas em humanos. Como informação adicional nesta *guideline*, outras vias podem ser selecionadas, porem a empresa deve justificar a escolha baseada por dados farmacológicos, farmacocinéticos/toxicocinéticos e toxicológicos. Nesta *guideline*, como referido acima, são regulados os estudos de toxicidade aguda como parte integrada nos estudos de estudos de administração reiterada

5.3. Dosagem

Em geral, conforme descrito no guia brasileiro (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

“A dose limite a ser testada será de 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. Em situações, em que essa dose não resulte em uma margem de 10 vezes a exposição clínica e a dose clínica exceda 1 grama por dia, deve ser considerada a menor dose disponível entre 10 vezes a exposição clínica, 2000 mg/kg/dia ou a máxima dose disponível.”

A dosagem estabelecida no Brasil coincide com as doses estabelecidas na *guideline* europeia CPMP/SWP/1042/99-R1 (2010a), entretanto o guia M3-R2 (2009a) complementa os dados da dose em casos raros.

O limite de dosagem considerado apropriado para os estudos toxicológicos de doses agudas, subcrônicas e crônicas, de acordo com o *guideline* ICH M3-R2, está fixado em 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. Porém, em algumas situações esse limite pode ser excedido se a dose de 1000 mg/kg/dia não resultar em uma exposição sistêmica de 10 vezes a exposição sistêmica clínica ou a dose clínica exceder 1g diário. Nesses casos, os testes de toxicologia deverão ser limitado a uma exposição sistêmica de 10 vezes a exposição clínica, ou uma dose de 2000 mg/kg/dia ou a MDT, sendo escolhida a menor dose entre as três opções supracitadas. Em casos raros, em que a dose de 2000 mg/kg/dia resulta em uma exposição sistêmica menor que a dose clínica pode-se considerar a utilização de uma dose maior que a MDT (International Conference on Harmonisation 2009a).

A *guidelines* CPMP/SWP/1042/99 - R1, também preconiza que idealmente, sob a dose mais alta, a exposição sistêmica do medicamento e/ou seu(s) principal(ais) metabólito(s) deva(m) ser um múltiplo significativo da exposição sistema (área sob a curva – AUC) (European Medicines Agency 2010a).

5.4. Período de Observação

Conforme preconizado no guia da Anvisa (2013), o período de avaliação dos animais deve ser de no mínimo 14 dias após a administração do fármaco. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes. Posteriormente, no mínimo uma vez ao dia.

As *guidelines* europeias também preconizam a observação por 14 dias, mas não define quantas observações por dia a empresa deva realizar, cabendo à empresa a escolha de tal procedimento. Para ambas as espécies, roedores e não roedores, deve-se usar dados controles pré-definidos das espécies para realizar a avaliação das variáveis do estudo quanto a morfologia, bioquímica e fisiologia. No caso de não roedores, os valores devem sofrer um pré tratamento a partir dos animais usados no estudo (European Medicines Agency 2010a; Olejniczak 2011).

5.5. Parâmetros a serem avaliados

Segundo a *guideline* SWP/CHMP/1042 - R1, durante o estudo deve-se monitorar: mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais, peso corporal, consumo de alimento e água, patologias clínicas (hematologia e bioquímica), latência, duração e reversibilidade da toxicidade, investigações anatomo/histopatológica e oftalmologia. Registros eletrocardiográficos deverão ser obtidos em espécie não-roedora (se for a espécie escolhida para o teste). Dentro de cada uma das áreas acima mencionadas devem ser selecionados parâmetros relevantes para permitir uma identificação do perfil de toxicidade, tendo como base os perfis farmacodinâmicos/farmacocinéticos (European Medicines Agency 2010a).

O guia Anvisa (2013) não descreve quais parâmetros devam ser observados nesse estudo.

6. Estudos de Toxicidade de Dose Reiterada

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S4 - Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing)

CPMP/SWP/1042/99 (R1)- *Guideline on Repeated Dose Toxicity*

Anvisa - Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

A primeira *guidelines* correlacionada com os estudos toxicológicos de dose reiterada foi publicado no ano de 1999 pela ICH, ICH S4 - *Note for Guidance on Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (rodent and non rodent toxicity testing)* (International Conference on Harmonisation 1998).

Com a finalidade de apresentar mais informações sobre os estudos de dose reiterada, no ano de 2000 a EMA publicou uma *guideline* específica para tais testes, intitulada CPMP/SWP/1042/99 - *Guideline on Repeated Dose Toxicity*. Em 2010 a *Safety Working Party* efetuou uma atualização (CPMP/SWP/1042/99 – R1) da *guideline* europeia sobre administração reiterada, para adequar-se a *guideline* ICH M3-R2 (European Medicines Agency 2010a).

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração de doses regulares. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvo, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, informações sobre a indicação da NOEL (*No Observable Effect Level*) e NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*), e talvez o potencial de reversibilidade dos efeitos tóxicos. Esta informação deve fazer parte da avaliação de segurança para apoiar a realização de ensaios clínicos em humanos e

posteriormente a autorização de comercialização (European Medicines Agency 2010a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

6.1. Modelo animal

No guia da Anvisa (2013), o modelo animal deve ser escolhido de acordo com o seguinte:

“Devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. A amostra deve contemplar números iguais de machos e fêmeas (a utilização de apenas um dos sexos deve ser justificada pela indicação). As espécies devem ser selecionadas com base em sua relevância para a extrapolação de dados para seres humanos, considerando a farmacocinética, farmacodinâmica e biodisponibilidade da substância teste, incluindo sua biotransformação.”

Além das informações descritas acima, é necessário ter especial atenção ao número de animais envolvidos no estudo conforme descrito anteriormente no item Modelo Animal da seção Estudos de Toxicidade de Dose Única.

Para o modelo animal as empresas geralmente escolhem para o roedor o rato e o não-roedor o cão como espécies alvo. O rato e o cão são geralmente escolhidos por serem espécies práticas e por haver grande conhecimento acerca destes animais, seus aspectos anatomofisiológicos, bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos. Outras espécies também podem ser alvo do estudo como ratinho para roedores, o macaco e o *mini-pig* (porco) como não-roedores. A escolha dos animais dependerá de qual for a espécie mais relevante ao estudo (Olejniczak 2011)

Em geral são determinados 4 grupos de estudo, e tais grupos são divididos em: grupo controle; dose baixa; dose intermediária; e dose alta. O número de animais de ambos os sexos deve ser suficiente para a interpretação correta dos dados. Para os roedores, cada grupo deve conter no mínimo 20 animais (10/sexo - estudo de 4 semanas) a 40 animais (20/sexo - estudo de 6 meses), conforme a necessidade da pesquisa e a duração do estudo. Os não-roedores são utilizados em menor número, contendo cada grupo, geralmente, à volta de 10 animais (Olejniczak 2011)

6.2. Via de administração

Conforme o guia brasileiro (2013) a via de administração deverá ser utilizada a via em que a droga será administrada em humanos, mas se a absorção em animais for limitada em relação ao homem, também uma via parenteral.

Segundo a *guidelines* CPMP/SWP/1042/99–R1 a via de administração deve ser a mesma pretendida para humanos. Porém, é possível escolher uma outra via de administração se devidamente justificada, e não apenas a via parenteral como sugere o guia Anvisa (European Medicines Agency 2010a).

A frequência de administração deve ser determinada caso a caso, levando em consideração o regime clínico que será utilizado em humanos e os dados de toxicologia/ farmacocinética/farmacodinâmica do composto. Em alguns casos uma administração mais frequente do que o previsto pode ser mais apropriada, devendo-se levar em consideração as variáveis cinéticas do composto. Esses dados não encontrados no guia Anvisa (European Medicines Agency 2010a).

6.3. Dosagem

Conforme o guia brasileiro (2013) as doses são descritas respectivamente:

“As doses utilizadas em estudos de administrações repetidas geralmente são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses. Geralmente 3 doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e não-roedores ou as situações particulares discutidas no item “dosagem” dos estudos de toxicidade de dose única. As demais doses são estabelecidas em seqüência decrescente sugerindo-se intervalos de 2 a 4 vezes.”

Segundo a *guideline* CPMP/SWP/1042/99–R1 são determinadas 4 grupos de estudo, sendo 3 grupos tratados com o composto teste e um grupo controle. As doses são divididas em baixa, intermediária e alta (European Medicines Agency 2010a).

- Dose baixa: suficiente para produzir um efeito farmacodinâmico ou o efeito terapêutico desejado;
- Dose intermediária: determinada como a média geométrica entre as doses alta e baixa;
- Dose alta: selecionada para permitir a identificação de toxicidade em órgãos alvos, outra toxicidade não específica, ou até para limitar a concentração da dose. A dose limite para os estudos de toxicidade aguda, subcrônica ou crônica de 1000mg/Kg/dia para roedores e não roedores é considerada apropriada para os estudos em geral. Porém existem casos em que essa dose não é suficiente, podendo a empresa alterar a dose mais alta conforme descrito na dosagem dos estudos de dose única;
- Grupo controle: geralmente destina-se somente à administração do veículo utilizado para a administração da substância teste, controle negativo. Em casos especiais, pode ainda incluir-se um grupo de controle positivo.

A duração recomendada para os estudos toxicológicos de dose reiterada é geralmente definida pela duração do tratamento humano, indicação terapêutica e o alcance do estudo proposto. Em princípio, a duração dos estudos conduzidos nas duas espécies de mamíferos, roedor e não roedor, deve ser igual ou exceder o tempo de duração dos ensaios clínicos até a duração máxima recomendada. Em circunstâncias em que tenha sido demonstrado um ganho terapêutico significativo os ensaios não-clínicos poderão ser estendidos para além da duração dos estudos toxicológicos de dose repetida, mas tal deverá analisado e decidido caso a caso (European Medicines Agency 2010a).

6.4. Período de observação

A duração recomendada para os estudos toxicológicos de dose repetida é geralmente definida pela duração do tratamento humano, indicação terapêutica e o alcance do estudo proposto. Em princípio, a duração dos estudos conduzidos nas duas espécies de mamíferos, roedor e não roedor, deve ser igual ou exceder o tempo de duração dos ensaios clínicos até a duração máxima recomendada. Em

circunstâncias em que tenha sido demonstrado um ganho terapêutico significativo os ensaios clínicos poderão ser estendidos para além da duração dos estudos toxicológicos de dose repetida, mas tal deverá ser analisado e decidido caso a caso (International Conference on Harmonisation 2009a).

De acordo com a Anvisa (2013) e com a ICH M3-R2 (2009a), a duração mínima dos estudos de Toxicidade de Doses Repetidas devem ser, respectivamente (Tabelas 2 e 3):

Tabela 2: Período de observação - Brasil

Período de Intervenção na Pesquisa Clínica	Duração Mínima dos Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas	
	Roedores	Não Roedores
Até 2 semanas	2 Semanas	2 Semanas
Entre 2 semanas e 6 meses	Mesma duração da Pesquisa Clínica	Mesma duração da Pesquisa Clínica
Acima de 6 meses	6 Meses	9 Meses

(Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Tabela 3: Período de observação – Europa/EUA/Japão

Maximum Duration of Clinical trial	Recommended Minimum Duration of Repeated-Dose Toxicity Studies to Support Clinical Trials	
	Rodents	Non-rodents
Up to 2 weeks	2 weeks	2 weeks
Between 2 weeks and 6 months	Same as clinical trial	Same as clinical trial
> 6 months	6 months	9 months

(International Conference on Harmonisation 2009a).

Além do período de observação descrito tanto pela Anvisa quanto pelo ICH, a *guidelines* ICH M3–R2 propõem ainda que em algumas situações a duração do estudo pode sofrer algumas alterações. Em populações de risco e em casos onde

haja uma diminuição nas condições de controlo na prática clínica pode-se aumentar a duração dos estudos não-clínicos levando a resultados mais seguros (International Conference on Harmonisation 2012b).

Em tais circunstâncias, como é o caso de classes terapêuticas com extensa experiência clínica em que se identificou um uso generalizado e superior ao indicado (i.e. ansiedade, rinites alérgicas e dor), é proposto que a duração dos estudos de dose repetida para suportar estudo clínico de 2 semanas a 3 meses, seja igual ou superior a 3 meses (Tabela 4). Esses dados não são encontrados no guia Anvisa (International Conference on Harmonisation 2009a).

Tabela 4: Período de observação – Europa/EUA/Japão

Duration of Indicate Treatment	Rodent	Non-rodent
Up to 2 weeks	1 month	1 month
> 2 weeks to 1 month	3 months	3 months
> 1 month to 3 months	6 months	6 months
> 3 months	6 months	9 months

(International Conference on Harmonisation 2009a).

Além das informações acima, a *guideline* ICH M3-R2 também solicita às empresas documentos que garantam a qualidade das substâncias usados na composição do medicamento teste. Cada lote utilizado nos estudos de toxicidade de dose repetida deve ser identificado. Deve ser apresentado para cada lote um documento com as características físico-químicas do novo composto e o certificado de estabilidade. Além disso, devem ser facultadas informações sobre a estabilidade da substância na formulação final. A empresa deve apresentar pelo menos um padrão, e os níveis de impurezas da substância teste devem ser similares ao produto que será usado nos ensaios clínicos e na comercialização. Caso o medicamento destinado à comercialização tenha impurezas significativamente diferentes das dos lotes de teste, tanto em termos de qualidade ou quantidade, estes podem necessitar de maior qualificação, conforme a *guideline - Notes for Guidance on Impurities: Note for guidance on Impurities in new drug substances* CPMP/ICH/2737/99, 2006 e ICH Q3A-R2 (European Medicines Agency 2010a).

A toxicologia e a farmacocinética dos excipientes usados pela primeira vez no domínio farmacêutico devem ser investigadas. Em princípio, devem ser realizados os mesmos estudos efetuados nas substâncias ativas. Em certos casos, é necessária a realização de tais estudos com formulação final do medicamento teste (princípio ativo + excipiente) (European Medicines Agency 2010a).

6.5. Parâmetros a serem avaliados

Segundo a Anvisa (2013), os parâmetros a serem avaliados são:

“Roedores: Mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água, patologia clínica (hematologia, bioquímica); duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anatomo e histopatológicas.

Não Roedores: Mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); oftalmologia; duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anatomo e histopatológicas.”

Conforme *guideline* CPMP/SWP/1042/99–R1, durante os estudos não-clínicos devem ser monitorados a ingestão de alimentos, comportamento geral, o peso corporal, parâmetros hematológicos, análise bioquímica, exames de urina e oftalmológica em ambas as espécies. Registros de eletrocardiograma devem ser realizados em não-roedores. Dentro de cada uma das áreas acima mencionadas, parâmetros relevantes devem ser selecionados para permitir a identificação do perfil de toxicidade. Os exames devem ser realizados em todas as doses. Os exames realizados durante o estudo também devem ser realizados no grupo controle. Os testes e a amostragem não devem ser realizados de maneira que influencie o resultado e confiabilidade do estudo. É necessário determinar os controlos e o pré-tratamento que serão utilizados nos dados colhidos durante o teste, permitindo assim gerar dados concisos (European Medicines Agency 2010a).

Devem ser evitados ou atenuados casos de dor e ansiedade/*stress* nos animais usados durante as pesquisas. Os Critérios para a tomada de decisão sobre a morte dos animais que estão sofrendo dor severa ou sofrimento são objeto de documento de orientação da OCDE 19 (2000). Os animais que morrem ou são

sacrificados durante o estudo devem ser autopsiados e se possível, submetidos a exame microscópico (European Medicines Agency 2010a).

A recolha dos dados finais do estudo deve estar completa assim que possível. Todos os animais envolvidos nos estudos deverão ser autopsiados. Além da autópsia, deverá ser conduzido uma análise histopatológica dos órgãos e tecidos listados no anexo I da *guideline* CHMP/SWP/1042/99-R1 (Figura 5) de todos os animais não-roedores envolvidos no estudo por grupo de dose. Nos roedores, a análise histopatologia deverá ser feita em todos os órgãos e tecidos do anexo I nos animais que estão inseridos nos grupos de alta dose e grupo controle. No grupo de dose baixa, a avaliação poderá ser restringida aos órgãos e tecidos que apresentem alterações patológicas importantes. Caso haja essas alterações em algum tecido ou órgão dos animais inseridos no grupo de dose alta, órgãos ou tecidos do anexo I também deverão ser examinados no grupo de dose baixa a fim de observar a relação exposição/resposta (European Medicines Agency 2010a).

Tabela 5: Anexo I, *guideline* CHMP/SWP/1042/99-R1

Organs and Tissues		
Adrenal Gland	Kidney	Epinal cord
Aorta	Liver	Spleen
Bone with bone marrow	Lung	Stomach
Brain	Lymph node(s)	Testis
Cecum	Mammary gland	Thymus
Colon	Ovary	Thyroid gland
Duodenum	Pancreas	Trachea
Epididymis	Parathyroid gland	Urinary bladder
Esophagus	Peripheral nerve	Uterus
Eye	Pituitary	Vagina
Gallbladder	Prostate	Other organs or tissues with gross lesions
Harderian gland	Salivary gland	
Heart	Seminal vesicle	
Illeum	Skeletal muscle	Tissues masses
Jejunum	Skin	

(European Medicines Agency 2010a).

Além dos dados toxicológicos da substância teste é importante coletar informações sobre a exposição sistêmica dos animais durante os estudos de toxicidade de dose repetida, que serão essenciais para a interpretação dos resultados no estudo, para a concepção de estudos posteriores e para a avaliação da segurança humana. Na Europa, EUA e Japão, os estudos toxicocinéticos são realizados de acordo com a *guideline* ICH intitulada CPMP/ICH/384/95 - *Note for guidance on Toxicokinetics: A Guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies* (European Medicines Agency 2010a).

A toxicocinética geralmente está integrada nos estudos de toxicidade. Vários componentes dos estudos de farmacocinética do medicamento teste e seus metabólitos serão necessários para a avaliação dos achados toxicológicos nos

estudos não-clínicos. O objetivo primário da toxicocinética é a descrição da exposição sistêmica alcançada em animais e sua relação dose/evolução temporal da toxicidade. Como objetivos secundários, é importante observar a relação da exposição alcançada com estudos de toxicologia existentes e avaliar a relevância dos resultados para a segurança clínica, dar suporte a escolha da espécie alvo e o regime de tratamento que será adotado nos demais estudo toxicológicos e fornecer informações que, em conjunto com os outros dados, contribuam para alcançar um desenho de estudo não-clínico adequado (International Conference on Harmonisation 1994a).

A quantificação da exposição sistêmica fornece uma avaliação das doses teste em várias espécies e auxiliará na interpretação das semelhanças e diferenças na toxicidade entre espécies, grupos de dose e sexos. Permite ainda a determinação das margens de segurança relativamente à exposição humanas nas condições clínicas. A exposição pode ser representado pela concentração no plasma (soro ou sangue) ou pela curva de concentração AUC (área sob a curva) de composto de origem e/ou metabólito(s). Em algumas circunstâncias é necessário a avaliação da toxicocinética dos metabólitos derivados dos medicamentos teste, principalmente quando (International Conference on Harmonisation 1994a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

1. Este é um pró-fármaco;
2. Quando o(s) metabólito(s) é(são) ativo(s) e contribua(em) significativamente para a resposta toxicológica nos órgão e tecidos, ou;
3. Quando o medicamento teste é amplamente metabolizado e sua dose/ação só é conseguida através da avaliação dos metabólitos.

7. Estudos de Genotoxicidade

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S2 (R1) - Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for Human Use

Anvisa - Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

Os testes de genotoxicidade começaram a ser matéria de preocupação das agências reguladoras internacionais por volta da década de 90. No ano de 1995, a ICH aprovou a primeira *guideline* fornecendo orientações sobre genotoxicidade, intitulada ICH S2A - *Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals*. Posteriormente em 1997, uma outra *guideline* no mesmo tópico foi aprovado pela ICH, intitulada S2B - *Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals*, Com o intuito harmonizar os testes aceites nas várias regiões ICH e estabelecer uma bateria de testes aceitáveis para todas as Autoridades Reguladoras, foi efetuada uma análise conjunta dos testes que eram prática corrente em cada uma das regiões. Em 2008 foi efetuada a revisão das *guidelines* existentes, culminando em 2011 na publicação de um documento único para regular a matéria, intitulado ICH S2-R1 - *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use* (International Conference on Harmonisation 2011).

Os estudos de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* desenhados através de vários mecanismos. Esses testes permitem a identificação do risco de um fármaco danificar o ADN (ácido desoxirribonucleico) e da sua propagação (fixação) dessa alteração. A propagação do dano na forma de mutação genética, cromossômica em grande escala ou recombinação são

considerados geralmente danos essenciais para o aparecimento de efeitos hereditários ou o desencadear de processos malignos. Numerosas alterações cromossômicas podem estar associadas com tumorigênese e podem indicar um potencial para o desencadeamento de aneuploidia em células germinais (International Conference on Harmonisation 2011).

Os compostos que apresentam resultado positivo nos testes de genotoxicidade são considerados como possuir o potencial de ser carcinogênico e/ou mutagênico em humanos e outras espécies. Enquanto a relação entre a exposição e a carcinogênese está facilmente estabelecido para humanos, existe uma grande dificuldade em provar a correlação entre exposição a mutagêneos e a ocorrência de doenças hereditárias pelo que os estudos de genotoxicidade têm sido usados principalmente para a previsão de carcinogenotoxicidade. Entretanto, a suspeita de que um composto possa induzir efeitos hereditários, pois mutações germinais estão claramente associados com doenças humanas, é considerado tão grave quanto a suspeita de indução de câncer (International Conference on Harmonisation 2011; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Segundo a *guideline* ICH M3-R2 (2009a), para suportar ensaios clínicos de dose única é geralmente considerado adequado a realização de um teste de mutação genética. Para os ensaios clínicos incluindo múltiplas doses, além do teste de mutação genética serão necessários também estudos adicionais de alteração cromossômica em mamíferos. Os testes de genotoxicidade devem estar finalizados antes do início dos ensaios clínicos de fase II. Caso os testes apresentem resultados positivos, testes adicionais deverão ser feitos com o objetivo de avaliar se a administração humana é considerada segura.

7.1. Testes padrão

A autorização de introdução no mercado de novos medicamentos requer uma avaliação abrangente do seu potencial genotóxico. Extensas revisões mostram que muito compostos que são mutagênicos nos testes de mutação bacteriana reversa (Ames) são carcinogênicos em roedores. A adição de testes *in vitro* com células de

mamíferos aumentam a sensibilidade na detecção de genotoxicidade e amplia a detecção de eventos genéticos, porém diminui a especificidade, isto é, aumenta a incidência de resultados positivos que podem não estar relacionados com carcinogenotoxicidade em roedores (International Conference on Harmonisation 2011).

A utilização de uma bateria em testes é considerada necessária uma vez que nenhum teste é capaz de detetar todos os mecanismos genotóxicos relevantes para a tumorigênese. São considerados como testes padrão para os estudos de genotoxicidade as seguintes opções (International Conference on Harmonisation 2011):

- Avaliação da mutagenicidade através do teste de mutação reversa bacteriana. Esse teste tem mostrado a detecção de mudanças genéticas relevantes e a maioria da genotoxicidade em roedores e carcinogénese humana;
- Avaliação de alterações cromossômicas em células de mamíferos *in vitro* e/ou *in vivo*.

Vários sistemas *in vitro* com células de mamíferos são largamente utilizados e considerados devidamente validados, entre eles estão: ensaio de aberração cromossômica metafásica, ensaio com micronúcleos e ensaios de mutação genética (MLA - *Mouse Lymphoma Assay*) com células de linfoma de ratinho (L517Y Tk – timidina quinase). Esses três testes são considerados atualmente igualmente adequados e portanto, considerados intercambiáveis para a avaliação de dano cromossômico quando utilizados em conjunto com outros testes de genotoxicidade. Por essa razão pode optar-se por uma análise em micronúcleos de eritrócitos (no sangue periférico ou medula óssea) ou em células de medula óssea em metafase. Na análise citogenética também podem ser usados linfócitos de animais tratados com a substância teste, embora tal método seja menos difundido (International Conference on Harmonisation 2011).

Nos testes *in vivo* e *in vitro* que avaliam aberrações cromossômicas em células em metafase podem ser detetados um amplo espectro de alterações na integridade cromossômica. Rutura da cromatina ou dos cromossomas podem resultar em formação de micronúcleos, portanto os testes que detetam tanto

aberração cromossômica como micronúcleos são considerados indicados para a detecção de clastógenos. Os micronúcleos também podem ser formados na fase de anáfase, desta forma será possível detectar o potencial dos compostos em induzir aneuploidia. O teste MLA detecta mutações no gene Tk que resulta tanto em mutações genéticas como em dano cromossômico, há evidências que esse teste possa demonstrar a perda de cromossomas (International Conference on Harmonisation 2011).

Existem duas opções de bateria de testes padrão que são considerados adequados para os estudos de genotoxicidade, tanto no Brasil como na Europa. Como pode ser visto abaixo (International Conference on Harmonisation 2011; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Opção 1

- Um teste para mutação genética em bactérias;
- Um teste citogenético para avaliação de dano cromossômico (*in vitro* - teste de aberração cromossômica em metáfase ou teste de micronúcleos) ou um teste *in vitro* de mutação genética em célula de linfoma tk de ratinho;
- Um teste *in vivo* para genotoxicidade, geralmente um teste de dano cromossômico utilizando células hematopoiéticas de roedores, também para micronúcleo ou aberrações cromossômicas em células na metáfase.

Opção 2

- Um teste para mutação genética em bactéria;
- Uma avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo usando células hematopoiéticas de rato e um segundo ensaio *in vivo*. A *guideline* ICH S2-R1 complementa descrevendo que o segundo teste normalmente é quebra da hélice de ADN em células do fígado, a menos que sua utilização não seja adequada.

Historicamente existe uma maior experiência com a Opção 1, obtida com as *guidelines* ICH S2A e S2B. Entretanto, as duas opções são consideradas igualmente aceitáveis. Quando ocorre resultado positivo nos ensaios *in vitro* com células de

mamíferos, os resultados claramente negativos em dois ensaios *in vivo* devidamente conduzidos, com tecido exposição adequados, são considerados provas suficientes para atestar a ausência de potencial genotóxico (International Conference on Harmonisation 2011).

Em ambas as Opções de estudos *in vivo* as doses podem ser administradas de forma única ou reiterada. Em casos de administrações reiteradas, os testes devem ser planejados para incorporar parâmetros genotóxicos (*endpoints*) ao estudo, se for justificado cientificamente. Quando mais de um parâmetro for avaliado em ensaios *in vivo*, recomenda-se estudos com dose única. Muitas vezes, existem suficientes informações sobre adequamento de dose nos estudos toxicológicos de dose reiterada antes de iniciar os estudos de genotoxicidade. Tais dados podem ser usados para determinar quando será apropriado utilizar dose aguda ou reiterada (International Conference on Harmonisation 2011).

Os resultados negativos dos compostos nos testes de genotoxicidade, realizados e avaliados conforme os parâmetros mais atuais descritos nas *guidelines*, fornecem garantia suficiente da ausência de atividade genotóxica e testes adicionais não serão necessários. Compostos que apresentem resultados positivos nos testes padrão deverão, dependendo do seu uso terapêutico, ser testados de forma mais ampla (International Conference on Harmonisation 2011).

Existem diversos ensaios *in vivo* que podem ser usados nos testes da Opção 2, sendo que alguns deles podem ser integrados nos estudos de dose reiterada. O fígado é o tecido tipicamente escolhido em função do nível de exposição e capacidade de metabolização, mas a escolha do tecido e do estudo devem basear-se no conhecimento sobre o potencial mecanismo de ação, do metabolismo *in vivo*, e o nível de exposição dos tecidos alvos (International Conference on Harmonisation 2011).

Mudanças numéricas em cromossomas podem ser evidenciadas em ensaios com células de mamíferos (*in vitro*) e ensaios de micronúcleos (*in vitro* e *in vivo*). Elementos dos protocolos padrão que podem indicar potencial genotóxico são a elevação no índice mitótico, indução de poliploidia e avaliação de micronúcleos. O teste preferencial nos testes citogenéticos da Opção 2 é o teste de micronúcleos

porque incluem uma maior capacidade para detetar perda cromossômica (potencial para aneuploidia) (International Conference on Harmonisation 2011).

O guia da Anvisa (2013), assim como o guia ICH S2-R1 (2011), descrevem que:

“Um ensaio de mutação genética é geralmente considerado suficiente para dar suporte a todos os estudos clínicos de dose única. Estudos com doses múltiplas necessitarão de suporte de pelo menos um dos dois conjuntos de testes descritos como “opção 1” e “opção 2”. E os resultados dos testes de genotoxicidade devem estar concluídos anteriormente à realização das Pesquisas Clínicas fase 2.”

A sugestão de tais testes não implica que outros estudos sejam inadequados ou inapropriados, e testes adicionais podem ser realizados para obtenção de mais dados sobre o composto. Espécies alternativas, incluindo não roedores, podem ser usadas conforme as necessidades do estudo, desde que o método empregue seja devidamente validado (International Conference on Harmonisation 2011).

Em alguns casos, os testes padrão podem ser modificados, sendo tal procedimento aconselhado (International Conference on Harmonisation 2011):

- Como suporte para estudos clínicos exploratórios;
- Para compostos-teste tóxicos em bactérias;
- Para compostos que tenham alerta estrutural para atividade genotóxica;
- Quando exista limitação em relação ao uso de testes *in vivo*.

Resultados de estudos comparativos têm demonstrado que, no sentido qualitativo, muitas mutações em células germinais são detetadas como genotoxicidade em testes com células somáticas, porém apresentam resultado negativo nos testes *in vivo* o que indica a ausência de genotoxicidade em células germinativas (International Conference on Harmonisation 2011).

7.2. Recomendações – Teste *in vitro*

7.2.1. Repetição de testes e interpretação

A reprodutibilidade dos resultados é um componente essencial da pesquisa, a qual envolve novos métodos e achados inesperados. No entanto para os testes padrão, amplamente utilizados nos estudos de genotoxicidade, não há necessidade de efetuar a sua replicação uma vez que estes são devidamente caracterizados e possuem controlos internos com o objetivo de evitar enviesamento dos estudos. Idealmente, os testes deveriam ser classificados claramente como positivo e negativo, no entanto alguns casos não se encaixam nos parâmetros predefinidos, sendo considerado um resultado equívocos. Os métodos estatísticos auxiliam na interpretação, mas não substituem uma interpretação biológica adequada. Um teste considerado equívoco pode gerar as seguintes situações: positivo, negativo ou novamente equívoco (International Conference on Harmonisation 2011).

7.2.2. Protocolo recomendado para Ensaio de Mutação Bacteriana (Ames)

7.2.2.1. Dosagem

De acordo com o guia Anvisa (2013):

“Para teste de Ames: Para bactérias, as concentrações máximas recomendáveis são de 5 mg/placa, quando não limitado por solubilidade ou citotoxicidade. Compostos com difícil solubilização têm sua concentração máxima de exposição limitada a sua solubilidade em veículo compatível com o sistema testado.”

O mesmo regime pode ser observado na *guideline* ICH S2-R1, a dose máxima recomendada nos estudos *in vitro* é de 5000 µg/placa (ou 5µL/placa para meios de cultura líquidos). No teste de Ames a deteção da toxicidade pode ser evidenciada pela redução do número de reversões, e/ou compensação ou diminuição das colônias (International Conference on Harmonisation 2011).

Ainda segundo a ICH CPMP/SWP/1042/99-R1, os meios de cultura podem apresentar limitações quanto a solubilidade, o aparecimento de precipitado deve ser monitorizado, podendo mesmo assim permitir a contagem das colónias bacterianas desde que o mesmo não interfira nos testes, toxicidade não seja limitante e a concentração da dose não tenha ultrapassado os 5000 µg/placa (ou 5µL/placa para meios de cultura líquidos). Se não for observada citotoxicidade, poderá ser usada

uma dose que apresente a menor precipitação, porém se for notado cito ou mutagenicidade, independente da solubilidade, a dose usada deverá ser a dose máxima (International Conference on Harmonisation 2011).

7.2.2.2. Desenho do estudo

O conjunto recomendado de estirpes bacterianas (OECD) inclui aquelas que detetam substituição de bases e mutações pontuais, como se segue (International Conference on Harmonisation 2011; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Mudança na ligação Guanina-Citosina (G-C):
 - *Salmonella typhimurium* TA98;
 - *Salmonella typhimurium* TA100;
 - *Salmonella typhimurium* TA1535;
- Mudança na ligação Adenina-Timina (A-T)
 - *Salmonella typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a;
 - *Salmonella typhimurium* TA102
 - *Escherichia coli* WP2 *uvrA* ou *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101).

As recomendações da OECD e IWGT (*International Workshops on Genotoxicity Testing*) diferem das ICH/Anvisa em que, um único ensaio de mutação bacteriana (Ames) é considerado suficiente quando o resultado é claramente positivo ou negativo, quando realizado com um protocolo adequado, incluindo todas as estirpes com e sem ativação metabólica, dose adequado e controles internos. Para compostos farmacêuticos, a incorporação em placa ou métodos de pré-incubação são considerados adequados para uma única experiência. Resultados equívocos ou falso-positivos podem indicar a necessidade de repetição dos testes, possivelmente com modificação do protocolo (International Conference on Harmonisation 2011).

7.2.3. Protocolo recomendado para ensaios com células de mamíferos

7.2.3.1. Dosagem

Segundo descrito no guia Anvisa (2013), para o teste Ames as concentrações máximas recomendáveis são de 5 mg/placa, quando não limitado por solubilidade ou citotoxicidade. Para células de mamíferos as concentrações máximas recomendáveis são de 1,0 mM ou 0,5 mg/mL, o que for menor, quando não limitado por solubilidade ou citotoxicidade. Essa dosagem também é recomendada pela ICH S2 – R1.

Além dos dados acima, a ICH CPMP/SWP/1042/99-R1 ainda sugere que quando a solubilidade limita a utilização da dose alta, se não for limitada pela citotoxicidade, pode-se usar uma dose menor, a que cause a menor quantidade de precipitado na cultura, desde que não interfira no teste. Para ensaios citogenéticos *in vivo*, nos testes de aberração cromossômica ou micronúcleos a citotoxicidade não deve exceder uma redução de 50% do crescimento celular. Para MLA a dose alta deve apresentar citotoxicidade entre 80 - 90%, medida por RGT (*Relative Total Growth*) entre 20 – 10% (International Conference on Harmonisation 2011).

7.2.3.2. Desenho do estudo

Para a avaliação citogenética de dano cromossômico em células na fase de metáfase, o protocolo inclui a realização de testes com e sem ativação metabólica, tendo controlos positivos e negativos adequados. Tratamento com o composto teste é de 3 a 6 horas, com um tempo de amostragem de aproximadamente 1,5 ciclos celulares normais desde o início do tratamento (International Conference on Harmonisation 2011).

O mesmo princípio aplica-se ao ensaio com micronúcleos, exceto que o tempo de amostragem é de 1,5 a 2 ciclos normais desde o início do tratamento. No ensaio de aberração cromossômica informações sobre ploidia pode ser verificada observando a quantidade de poliploidias metafásicas como uma percentagem de incidência por célula em metáfase (International Conference on Harmonisation 2011).

Para MLA, o protocolo deve incluir testes com e sem ativação metabólica, controles positivos e negativos apropriados, onde o tratamento com o composto é de 3 a 4 horas. Um tratamento continuado sem ativação metabólica durante aproximadamente 24 horas deve ser realizado, quando os ensaios apresentarem resultado negativo ou equivocado (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3. Recomendações – Teste *in vivo*

7.3.1. Teste para detecção de dano cromossômico

Ambos os testes, aberração cromossômica e micronúcleos, em células de medula óssea são apropriados para detecção de clastogênese. Sistemas de análises automatizados (análise de imagem e citometria de fluxo) também podem ser usados se estiverem devidamente validados. O teste de aberração cromossômica também pode ser realizado em cultura de linfócitos periféricos de roedores tratados (International Conference on Harmonisation 2011).

Os testes padrão *in vivo* descritos na opção 2 podem ser usados como testes confirmatórios no decorrer da avaliação dos resultados de outros testes *in vivo* e *in vitro*. Embora a observação dos efeitos do composto nos testes *in vitro* e o conhecimento sobre o mecanismo de ação possam ajudar a orientar a escolha dos testes *in vivo*, quando se trata de genes humano específicos não é possível realizar a investigação de aberrações cromossômicas e mutações genéticas utilizando os métodos padrão na maioria dos tecidos. Tal condição pode ser remediada utilizando roedores transgênicos, embora tal implique um tratamento mais prolongado (28 dias) para permitir a expressão da mutação, fixação e acumulação, especialmente em tecido com uma taxa baixa de divisão celular. Sendo assim, o segundo ensaio *in vivo*, muitas vezes, é usado para avaliar um dado específico (*endpoint*) (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3.2. Seleção de dose para os ensaios *in vivo*

Segundo o guia formulado pela Anvisa (2013), para os estudos de curta duração (usualmente de 1 a 2 administrações) a dose máxima indicada para os ensaios de genotoxicidade é de 2000 mg/Kg se está é tolerada, ou a máxima dose em que níveis mais altos seriam esperados para a produção de letalidade. Doses mais baixas são geralmente espaçadas em aproximadamente dois a três intervalos de vezes inferiores a essa dose. Os mesmos dados podem ser observados na ICH S2-R1 (2011).

Ainda segundo a *guideline* S2-R1, recomendação semelhante foi feita para os testes de mutação transgênica. Deve-se levar em consideração a ocorrência de supressão da produção de células sanguíneas na medula óssea durante a seleção da dose. As doses mais baixas são geralmente de 2 a 3 vezes menores que a dose alta (International Conference on Harmonisation 2011).

Conforme descrito no guia Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

“Protocolos de longa duração (Estudos de Administração Múltipla): Três níveis de doses sendo que a dose máxima deve ser: a máxima dose tolerada, 1000 mg/kg para estudos de 14 dias ou maiores, se esta dose é tolerada ou a dose que leva à saturação da exposição.”

Nos estudos com doses reiteradas vários critérios são especificados para a escolha das doses. Na opção 1, quando os testes de genotoxicidade *in vivo* são integrados nos estudos de toxicidade de administração reiterada, as doses são geralmente consideradas apropriadas quando o estudo toxicológico satisfaz os critérios desejados para que o estudo dê suporte adequado aos ensaios clínicos. Tais critérios são diferentes dos recomendados pela *guideline* da OECD para os ensaios de micronúcleos *in vivo*. Essas informações aplicam-se quando os testes *in vitro* com células de mamíferos forem negativos (ou positivo não relevante) (International Conference on Harmonisation 2011).

Ao realizar estudos de acompanhamento para avaliar um efeito genotóxico, ou quando o estudo for realizado conforme a Opção 2 com ausência de estudos *in vitro* em células de mamíferos, vários fatores deverão ser avaliados para determinar se a dose máxima é apropriada para o estudo de genotoxicidade. Qualquer um dos critérios listados abaixo são considerados suficientes para demonstrar que a dose

alta dos estudos de toxicologia (realizados tipicamente em ratos) é apropriada para análise de micronúcleos e para outros testes genotóxicos (International Conference on Harmonisation 2011):

- Máxima dose tolerada:
- Limite máximo da dose em 1000 mg/kg para estudos acima de 14 dias, se for tolerado;
- Máxima exposição possível demonstrada quer por atingir o plateau de saturação ou pela acumulação do composto. Diminuição da exposição pode desqualificar o estudo. Qual tal ocorre em um dos sexos geralmente os dados do género com menor exposição serão retirados do estudo, a menos que haja uma melhor exposição a um metabolito de interesse;
- Dose máxima é $\geq 50\%$ da dose máxima usada em dose aguda, isto é, perto da dose letal mínima.

Não é apropriada a seleção da dose máxima baseada apenas em dados de exposição, sem os estudos de toxicidade (International Conference on Harmonisation 2011).

Muitos compostos que induzem aneuploidia, são detetados em ensaios de micronúcleos *in vivo* em medula óssea ou sangue periférico apenas em faixas de concentrações muito próximas das doses tóxicas. Esse fato também pode ser observado para clastogénese. Caso os resultados indiquem uma toxicidade severa para as linhagens de células sanguíneas, a dose pode ser reduzida em até 2 vezes a dose citotóxica. Se não forem incluídas doses adequadas nos estudos multi-semanas, dados adicionais que possam contribuir para a deteção de aneuploidia ou clastogénese poderiam derivar das seguintes opções (International Conference on Harmonisation 2011):

- Colheita de amostras de sangue no início do estudo (entre 3-4 dias) é aconselhável quando há aumento da toxicidade em função do tempo de tratamento (hemotoxicidade). A amostra inicial pode ser usada para fornecer quais os potenciais de clastogénese e aneuploidias são detetados;
- Ensaios com micronúcleos em células de mamífero – *in vitro*;

- Ensaio de dose aguda em medula óssea – micronúcleos.

7.3.3. Tempo de amostragem

Quando o ensaio de micronúcleo está integrado com estudos de múltiplas semanas, a coleta de amostras de sangue periférico ou medula óssea poderá ser feita no dia a seguir ao da administração final. Para outros testes de genotoxicidade, o tempo de amostragem será definido conforme os critérios da pesquisa. Por exemplo nos testes que avaliam dano de ADN as amostras são colhidas, geralmente, de 2 a 6 horas após a última administração em estudo de múltiplas doses. Em casos de dose única, dois períodos de amostragem são usados – poucas horas e 24 horas após o tratamento (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3.4. Modelo animal

Conforme preconizado pela Anvisa (2013):

“Para o teste de micronúcleos *in vivo* recomenda-se a utilização de roedores (camundongos ou ratos), apenas um sexo, de preferência machos, desde que não haja dados que indiquem a discrepância de toxicidade entre os sexos. Quando substâncias sexo específicas estão sendo testadas, o ensaio deverá ser realizado no sexo apropriado.”

O rato e o ratinho são considerados apropriados para os testes de micronúcleos em células de medula óssea. Os micronúcleos podem ser mensurados analisando eritrócitos imaturos em sangue periférico de ratinho ou reticulócitos recentemente formado em sangue periférico de rato. Outras espécies podem ser usadas nos testes desde que mostrem adequada sensibilidade a detecção de clastogênese e aneuploidia induzida em medula óssea ou sangue periférico (International Conference on Harmonisation 2011).

O número de animais analisados é determinado por recomendações atuais para os ensaios de micronúcleo (OECD) ou outros ensaios de genotoxicidade, e geralmente não inclui todos os animais tratados nos estudos de toxicidade. Os

animais são escolhidos de forma randomizada a partir dos grupos testes usados nos estudos de toxicidade (International Conference on Harmonisation 2011).

Se o composto teste for dependente do sexo dos animais, os ensaios deverão priorizar a escolha dos animais do sexo apropriado. Os ensaios *in vivo* com protocolo de dose única podem, geralmente, ser realizados em apenas um dos sexos (macho ou fêmea). Em tais protocolos, ambos os sexos devem ser considerados apenas quando houver dados de toxicidade e metabolismo que indique uma diferença substancial entre os gêneros. Caso contrário, o uso de machos por si só é considerado adequado para os testes de genotoxicidade aguda. Princípios similares podem ser aplicados para outros testes de genotoxicidade *in vivo* (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3.5. Via de administração

Segundo a Anvisa (2013) a via de administração (quando aplicável) deverá aquela preconizada para uso humano.

Conforme a ICH, a via de administração é aquela preconizada para o uso clínica em humanos, isto é, oral, intravenoso ou subcutâneo. Mas pode ser modificado se for necessário para obter exposição sistêmica, como é o caso de compostos de aplicação tópica (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3.6. Demonstração de exposição em tecidos alvo com resultado negativo

O teste *in vivo* tem um papel estratégico importante nos testes de genotoxicidade. O valor dos resultados está diretamente relacionado com a demonstração da exposição adequada do tecido alvo em relação ao composto teste. Isto é especialmente verdadeiro para resultados *in vivo* negativos quando testes *in vitro* demonstraram evidências convincentes de genotoxicidade, ou quando não são efetuados testes *in vitro* com células de mamíferos (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3.6.1. Quando o teste de genotoxicidade *in vitro* é positivo

A avaliação da exposição deve ser feita com a dose alta ou outra dose relevante, usando a mesma espécie alvo e a mesma via de administração. A demonstração da exposição pode ser feita da seguinte maneira (International Conference on Harmonisation 2011):

- Citotoxicidade
 - Testes citogenéticos – analisando uma mudança na relação eritrócitos imaturos/eritrócitos totais ou uma redução significativa do índice mitótico;
 - Outros estudos genotóxicos *in vivo* – toxicidade hepática ou em outro tecido a ser avaliado.
- Exposição
 - Avaliação de concentração plasmática;
 - Avaliação da concentração do composto no tecido alvo.

Se a exposição sistêmica é similar ou inferior a exposição clínica, podem ser adotadas estratégias alternativas, tais como (International Conference on Harmonisation 2011):

- Troca de via de administração;
- Usar outra espécie que tenha alta exposição;
- Usar outro tecido alvo ou outro ensaio.

Quando não há uma boa exposição ao medicamento teste os testes convencionais *in vivo* têm pouco valor (International Conference on Harmonisation 2011).

7.3.6.2. Quando o teste de genotoxicidade *in vitro* é negativo

Se os testes *in vitro* não demonstraram potencial genotóxico para determinado composto, a exposição *in vivo* (sistêmica) pode ser determinada por qualquer outro método descrito anteriormente, ou pode ser assumida a partir dos

resultados de testes padrão de farmacocinética/toxicocinética (absorção, distribuição, metabolização e excreção) feitos em roedores (International Conference on Harmonisation 2011).

7.4. Método para interpretação dos Parâmetros obtidos

Segundo a Anvisa (2013), os seguintes dados devem ser avaliados:

“Os testes acima devem ser capazes de revelar resultados claramente “positivos” ou “negativos”, entretanto, alguns dos resultados dos testes acima não podem ser apresentados na forma de “positivo” ou “negativo” sob critérios pré-determinados, portanto são declarados inconclusivos após a aplicação de interpretações estatísticas e interpretação biológica adequada. Em casos inconclusivos ou fracamente positivos pode haver a necessidade da repetição do ensaio, eventualmente com a modificação do protocolo como, por exemplo, o espaçamento dos níveis das concentrações

Compostos que apresentam resultados “positivos” nos testes supracitados são potencialmente agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos para seres humanos. Apesar da relação entre exposição a agentes químicos e carcinogênese se encontrar estabelecida em humanos, tem sido difícil a avaliação da transmissão hereditária de alterações provocadas por tais agentes, portanto os testes de genotoxicidade têm sido utilizados, principalmente, para a previsão de potencial carcinogênico.”

Como já descrito anteriormente, os testes padrão são suficientemente bem caracterizado e possuem controlos internos em que a repetição de um ensaio com resultados claramente positivo ou negativo não é justificado. Idealmente, deve ser possível declarar os resultados claramente negativos ou positivo, mas nem sempre é essa a situação que apresenta-se nos ensaios (International Conference on Harmonisation 2011).

Segundo a ICH S2-R1, ensaios comparativos vem demonstrando que os estudos *in vitro* geram tanto resultados falsos negativo como falsos positivo em relação a previsão de carcinogenicidade em roedores. A bateria de teste de genotoxicidade (*in vivo* e *in vitro*) detetam mecanismos que envolvam dano genético direto, portanto esses testes não são ideais para a avaliação de carcinogenicidade através de mecanismo não genotóxico. Os testes foram projetados para reduzir a incidência de falsos negativos. Por outro lado, um resultado positivo em qualquer ensaio de genotoxicidade nem sempre significa que o composto teste representa um

risco genotóxico/carcinogênico para humanos (International Conference on Harmonisation 2011).

Embora resultados positivos nos testes *in vitro* indiquem genotoxicidade intrínseca do composto, os testes *in vivo* é que determinarão a importância biológica desses sinais na maioria dos casos. Também, porque existem vários mecanismos indiretos de genotoxicidade que são observados acima de determinadas concentrações, dessa forma é possível estabelecer um limiar seguro para classe de fármacos que apresentam tais mecanismos. Nos testes *in vitro* é importante observar as propriedades intrínsecas das estirpes usadas nos estudos, a fim de descartar as anomalias geradas espontaneamente. O mesmo deve ser observado nos testes *in vivo*, onde mecanismos podem ser ou não relevantes para o homem (International Conference on Harmonisation 2011).

Os ensaios *in vivo* são vantajosos por levarem em consideração a absorção, distribuição, e excreção, aspectos que não são considerados nos estudos *in vitro* mas podem ser potencialmente relevantes para o uso humano. Além disso, o metabolismo tende a ser mais relevante nos testes *in vivo* que nos testes *in vitro* (International Conference on Harmonisation 2011).

Nos casos em que exista pequenos aumentos na genotoxicidade aparente nos testes *in vivo* e *in vitro* é necessário primeiro avaliar a reprodutibilidade e o significado biológico do teste. Nesses casos, observa-se uma falta de potencial genotóxico, sendo considerado um resultado negativo ou não relevante biologicamente. Não havendo necessidade de testes adicionais (International Conference on Harmonisation 2011).

Resultados positivos no teste de Ames devem ser devidamente avaliados nos testes mutagênicos e carcinogênicos *in vivo* para avaliar o potencial risco em humanos. Alguns testes *in vitro* podem gerar resultados falsos positivo que estão mais relacionados com aumento de artefactos em colônias. Tais achados podem acontecer devido a contaminação de culturas com aminoácidos (histidina - *Salmonella typhimurium* e triptofano - *Escherichia coli*) ou metabolismos específicos de bactérias (nitrorredutases bacterianas) (International Conference on Harmonisation 2011).

Os testes *in vivo* possuem a vantagem em relação aos testes *in vitro* pois avaliam a absorção, distribuição, excreção e metabolismo do fármaco teste em animais, que são potencialmente mais relevantes ao uso humano. Porém resultados *in vivo* também podem gerar resultados falsos positivos, como exemplo tem-se o aumento de micronúcleos que pode ocorrer sem a administração de qualquer agente genotóxico, ocorrerem devido a perturbações na eritropoiese. Sendo assim, é necessário avaliar os dados de genotoxicidade levando em conta todos os dados toxicológicos e hematológicos encontrados em outros estudos. Como exemplo pode-se citar a procarbazina, hidroquinona uretano e o benzeno que são substâncias genotóxicas, detetadas de forma segura pelos testes de medula óssea para lesões cromossômicas, mas tiveram resultados negativos/fraco/conflituantes em testes *in vitro* (International Conference on Harmonisation 2011).

Entretanto, há compostos para os quais muitos testes *in vivo* não fornecem informações adicionais úteis. Estes incluem compostos para os quais os dados sobre toxicocinética ou farmacocinética indicam que não são absorvidos sistemicamente e, por conseguinte, não estão disponíveis para os tecidos alvo. Como exemplos pode-se citar alguns agentes radiofármacos, antiácidos à base de alumínio, alguns compostos administrados por inalação e alguns compostos administrados dermicamente ou por outra via de administração tópica. Nos casos em que a modificação da via de administração não fornece uma exposição suficiente e nenhum ensaio de genotoxicidade adequado está disponível, pode ser apropriado fundamentar a avaliação apenas em testes *in vitro*. Em alguns casos, a avaliação de efeitos genotóxicos no local de contacto pode ser suficiente, porém tais ensaios ainda não foram utilizados amplamente (International Conference on Harmonisation 2011).

Pode-se realizar estudos adicionais para os compostos que obtiveram resultado negativo nos testes padrão de genotoxicidade, mas demonstraram um aumento no aparecimento de tumores nos testes de carcinogenicidade e possuem evidências insuficientes para estabelecer um mecanismo não genotóxico. Nesses casos, para elucidar o mecanismo de ação os ensaios adicionais podem incluir testes em condições modificadas para a ativação metabólica *in vitro* ou indução de tumorigênico *in vivo* para medição de danos genéticos em órgãos-alvo, tais como

quebra de cadeia de ADN, teste em fígado UDS, ligação covalente ao ADN (32P-postlabelling), indução de mutação em transgenes ou caracterização molecular de alterações genéticas em genes relacionados ao tumor (International Conference on Harmonisation 2011).

Atualmente já estão disponíveis testes de micronúcleos em cão e macaco, são opções de espécies alternativas para avaliação de metabólitos humanos que não são devidamente evidenciados em roedores mas são formados em cão e macaco (International Conference on Harmonisation 2011)

8. Estudos de Carcinogenicidade

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S1A - *Guideline* on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals

ICH S1B - Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals

ICH S1C (R2) - Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals

Anvisa - Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

A primeira *guideline* sobre o estudo da carcinogenicidade para compostos farmacêuticos foi publicada em 1995, intitulada ICH S1A - *Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals*. O objetivo desta *guideline* é definir as condições sob as quais os estudos de carcinogenicidade devem ser realizados para evitar o uso desnecessário de animais em testes bem como harmonizar a avaliação regulamentar entre Europa, EUA e Japão (International Conference on Harmonisation 1995).

Para complementar as informações sobre carcinogenicidade foram publicadas em 1997 outras duas *guidelines* intituladas ICH S1B - *Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals* e ICH S1C-R2 - *Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals*, sendo que esta última *guideline* passou por duas revisões, uma em 2005 e outra em 2008. Esses guias têm como objetivo fornecer orientações sobre os métodos harmonizados para avaliar o potencial carcinogénico de produtos farmacêuticos (International Conference on Harmonisation 1997; International Conference on Harmonisation 2008).

Na última revisão da ICH S1C-R2, os parâmetros farmacocinéticos definidos pela exposição sistêmica dos animais foi incluída como critério para determinar a dose máxima de modo igual para os fármacos genotóxicos e não genotóxicos. Essa

mudança tem implicações sobre o refinamento do estudo, isto é, na melhoria do bem-estar animal (3R) reduzindo a dor ou o desconforto dos animais (International Conference on Harmonisation 2008).

Em 2002 a EMA publicou a *guideline* CPMP/SWP/2877/00 com a finalidade de dar orientações sobre aspectos práticos da condução de estudos de carcinogenicidade de longo prazo, bem como no desenho estatístico e análise de dados (European Medicines Agency 2002a)

Os estudos de carcinogenicidade têm por objetivo a identificação do potencial tumorogénico em animais (genotóxico e não-genotóxico), como parte da avaliação do risco para o uso de novos medicamentos em humanos. Os fármacos carcinogénicos não genotóxicos podem ser definidos como medicamentos que induzem o desenvolvimento de tumores em, pelo menos, uma espécie de roedor, sem interagir diretamente com o ADN. Já os genotóxicos são os que atuam causando dano genético diretamente (Silva Lima & J W Van der Laan 2000; European Medicines Agency 2002a).

Em geral, estes fármacos atuam modificando a fisiologia normal de órgãos específicos ou sistemas por meio de hiperestimulação persistente, levando a uma intensificação da replicação celular. Isto pode intensificar a ocorrência de mutações espontâneas e diminuir a probabilidade de reparação do ADN a nível celular, de fontes endógenas e exógenas, isto é, causando mutações antes que o ADN possa ser reparado (Silva Lima & J W Van der Laan 2000).

Os compostos considerados carcinogénicos não-genotóxicos possuem múltiplos mecanismos de ação e a falta de compreensão suficiente dos eventos celulares e moleculares envolvidos nos mecanismos de ação ainda não permite o desenvolvimento adequado de uma bateria de testes de curto/médio prazo. Sendo assim, o teste mais indicado para essa classe de medicamentos são os estudos de longo prazo em roedores. O aumento da preocupação com fármacos epigenéticos sugere a necessidade de uma avaliação aprofundada durante o programa de toxicidade para avaliação da segurança para o uso humano (Silva Lima & J W Van der Laan 2000).

Qualquer informação relevante derivada de investigações laboratoriais, estudos toxicológicos em animais e dados em humanos podem gerar a necessidade

de estudos de carcinogenicidade. Esse estudo era exigido para todos os compostos que fossem administrados regularmente durante uma parte substancial do tempo de vida do paciente. Atualmente, resultados de estudos de genotoxicidade, toxicocinética e estudos mecanísticos podem ser rotineiramente utilizados para avaliar o perfil de segurança não-clínica. Esses dados adicionais são importantes não só para confirmar/descartar estudos de carcinogenicidade mas também para interpretar os resultados do estudo em relação a sua relevância à segurança humana (International Conference on Harmonisation 1995).

Estrategicamente, os testes para avaliar o potencial carcinogénico de um produto farmacêutico são realizados após a obtenção de informações chave que incluem resultado dos estudos de genotoxicidade, população alvo, dosagem clínica, farmacodinâmica em animais e humanos e estudos de toxicidade de dose reiterada. Este último, pode indicar que o composto pode apresentar propriedades imunossupressoras, ativação da produção hormonal ou outra atividade considerada como risco de carcinogénese humana porém não genotóxicos (International Conference on Harmonisation 1997).

Como descrito anteriormente, os estudos não-clínicos em compostos teste considerando potencialmente genotóxico normalmente são interrompidos na fase inicial. Porém existem inúmeros fármacos que apresentaram resultado negativo para genotoxicidade e posteriormente evidencia-se toxicidade carcinogénica. Os compostos que apresentam carcinogenicidade não-genotóxica podem ser definidos como aqueles que induzem o desenvolvimento de tumores em, pelo menos, uma espécie de roedor, sem interagir diretamente com o ADN. Mais especificamente os efeitos tóxicos não-genotóxicos estão ligados aos mecanismos, além das citadas, de injúria celular crônica, ativação da CYP450 e ativação de recetores (Silva Lima & J W Van der Laan 2000).

8.1. Fatores que determinam a necessidade da execução dos estudos de carcinogênese

As considerações fundamentais na avaliação da necessidade de estudos de carcinogenicidade são a duração máxima do tratamento em humanos e qualquer sinal de preocupação identificado em outras investigações. Outros fatores também podem ser considerados nesta decisão, tais como a população alvo, avaliação prévia do potencial carcinogénico de fármacos similares ou da mesma classe, grau de exposição sistêmica, semelhança a compostos endógenos (International Conference on Harmonisation 1995).

Em relação à duração e exposição, os estudos de carcinogenicidade devem ser realizados para medicamentos cujo uso clínico esperado se dê de forma contínua por um mínimo seis meses. Certas classes medicamentosas podem não ser usadas continuamente acima de um mínimo de seis meses, mas podem ser propostas para serem utilizadas repetidamente ou intermitentemente no tratamento crónico ou em condições recorrentes (por exemplo: medicamentos para rinite alérgica, depressão e ansiedade), nesses casos os estudos de carcinogenicidade são necessários. Para medicamentos administrados de forma não frequente por curta duração de exposição, em princípio, não é necessária a realização de estudos de carcinogenicidade (International Conference on Harmonisation 1995; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A Anvisa ainda descreve outros casos que podem gerar a necessidade de realização de estudos de carcinogenia tais como: fármacos pertencente a uma classe terapêutica com potencial efeito carcinogênico; relação estrutura/atividade que sugira efeitos tóxicos; evidência de lesões pré-neoplásicas em estudos de toxicidade em dose reiterada; retenção do composto ou seus metabólitos nos tecidos com alterações patofisiológicas observáveis; e quando houver preocupação com o potencial fotocarcinogénico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Para certos medicamentos desenvolvidos para algumas doenças graves os testes de carcinogenicidade não precisam ser realizados antes de serem aprovados para comercialização. Isso acelera a disponibilização de medicamentos para doenças potencialmente fatais ou gravemente debilitantes, especialmente onde não existe terapêutica alternativa satisfatória. No caso em que a esperança de vida da população alvo é curta (inferior a 2 e 3 anos) tais estudos não são necessários (International Conference on Harmonisation 1995).

A Anvisa ainda acrescenta sobre esse tema que substâncias utilizadas topicamente necessitam desses estudos, entretanto, fármacos que demonstrem pouca exposição sistêmica proveniente de uso tópico (dérmica ou ocular) em humanos podem não necessitar de ensaios orais para avaliar o potencial carcinogênico a órgãos internos. Compostos comprovadamente genotóxicos, na ausência de outros dados, são presumidamente carcinogêneos e não necessitam de estudos. E também com substâncias endógenas administradas essencialmente como terapias repositórias (isto é, níveis fisiológicos), especialmente se houver experiência clínica com produtos similares (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

8.2. Modelo animal

O guia Anvisa (2013) propõe para os estudos de carcinogênese:

“O esquema padrão de carcinogenicidade compreende um estudo em roedor de longo prazo e:

- 1- Um estudo de curto e médio prazo em roedores *in vivo* que podem incluir modelos de iniciação/promoção em roedores, ou modelos de carcinogenicidade usando transgênicos ou roedores neonatais ou;
- 2- Estudo a longo prazo de carcinogenicidade em uma segunda espécie roedora.

As espécies selecionadas devem ser apropriadas, baseadas nas seguintes considerações:

- a- Farmacologia
- b- Toxicidade em doses repetidas
- c- Metabolismo
- d- Toxicocinética
- e- Via de administração

Na ausência de evidências claras favorecendo uma espécie, é recomendado o uso do rato.

Da mesma forma, a *guideline* ICH S1A propõe um esquema básico para os testes carcinogênico que envolvem 2 estudos (Silva-Lima & J. W. van der Laan 2002):

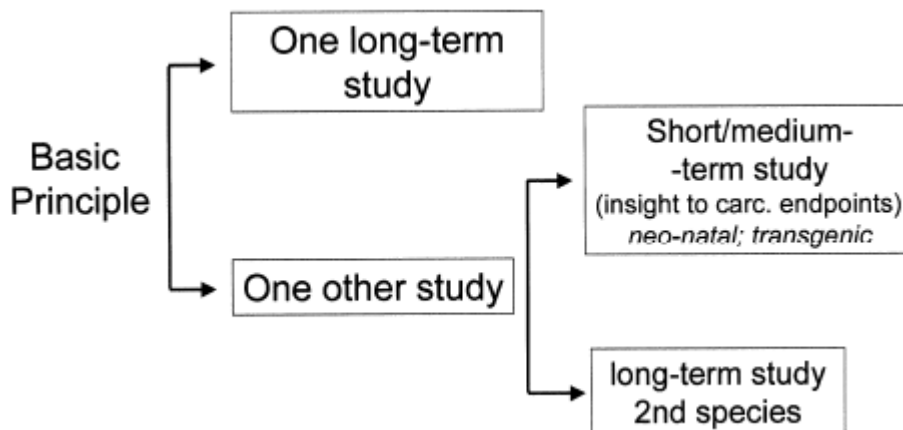


Figura 7: Princípios básicos na escolha dos testes de carcinogenicidade (Silva-Lima & J. W. van der Laan 2002).

Assim como na Anvisa, na ausência de evidência clara favorecendo a escolha de uma espécie, recomenda-se que os estudos a longo prazo sejam conduzidos em rato (International Conference on Harmonisation 1997; European Medicines Agency 2002a).

Os estudos adicionais podem ser de curto a médio prazo em roedores (*in vivo* ou a longo prazo em uma segunda espécie roedora. O primeiro teste tem como objetivo fornecer dados adicionais aos estudos que podem incluir modelos de iniciação/promoção em roedores, modelos transgênicos ou neonatal (International Conference on Harmonisation 1997).

Os estudos de curta e média duração devem ser capazes de identificar carcinogêneos humanos relevantes entre os compostos não-genotóxicos ou fornecer uma visão mecanicista complementar para o resultado positivo obtido em ratos (Silva-Lima & J. W. van der Laan 2002).

A nível regulamentar, os modelos transgênicos identificados como aceitáveis nos estudos de carcinogenicidade (genotóxica e não-genotóxica) são TgrasH2 e p53 +/- TgAc sobretudo para medicamentos para aplicação tópica. Os dados existentes não sugerem superioridade de um modelo sobre o outro para um determinado composto, mecanismo de ação tumorigênico ou outras condições específicas. Animais do tipo selvagem devem ser utilizados em todos os testes (exceto para

estudos de TG-AC), tais resultados adicionarão informações acerca da variação genética (European Medicines Agency 2004).

Além dos dados descritos, a *guideline* europeia CPMP/SWP/2877/00 contem alguma informação adicional (European Medicines Agency 2002a):

- A escolha da espécie deve ser apropriada;
- Tais estudos devem começar assim que possível após o desmame, isto é, assim que os animais estiverem habituados à dieta;
- Os animais devem ser saudáveis e livre de patógenos;
- Se houver sacrifício de animais durante os estudos, um número adequado de animais deverá estar incluído nos desenhos do estudo de modo a garantir o peso estatístico dos resultados. Deste modo o número de animais poderá aumentar.

Na prática, estudos de carcinogenicidade são realizados em um número limitado de ratos ou determinadas linhagens de ratinhos os quais existam informações sobre a incidência de tumores espontâneos. A melhor opção é a escolha de espécies/linhagem de animais que possuam um perfil metabólico o mais similar possível do perfil humano. Os estudos devem ser conduzidos em machos e fêmeas em todas as espécies/linhagem existentes no estudo (International Conference on Harmonisation 2008).

Dados históricos podem ser usados para a avaliação dos dados de carcinogenicidade, porém os dados obtidos devem ser de estudos realizados nos últimos 5 anos anteriormente ao novo estudo, levando em consideração alterações dos componentes genéticos entre cada estudo. Dados da literatura podem adicionar informações ao estudo (European Medicines Agency 2002a).

8.3. Via de Administração

Conforme o guia Anvisa e europeu, a via de administração deve ser similar à preconizada para uso humano. Caso haja demonstração de metabolismo e exposição sistêmica similares por outras vias de administração, então, os ensaios de carcinogenicidade podem ser conduzidos por uma única via, garantindo que órgãos

importantes na via clínica sejam expostos adequadamente. A demonstração de exposição de tais órgãos pode ser evidenciada por dados farmacocinéticos (European Medicines Agency 2002a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

8.4. Dosagem

Idealmente, a seleção da dose para os ensaios em animais deve apresentar uma exposição ao composto em que (1) permita uma margem de segurança adequada a exposição terapêutica humana, (2) seja tolerável sem desenvolver disfunções fisiológicas crônicas significativas e que permita uma boa taxa de sobrevivência, (3) seja guiado por dados compreensivos em animais e humano focando substancialmente as propriedades do composto e a adequabilidade do modelo animal, e (4) permitir a interpretação dos dados no contexto da sua utilização clínica (International Conference on Harmonisation 2008).

Conforme descrito no guia Anvisa (2013):

“Alguns aspectos a serem considerados na escolha de doses são descritos a seguir, mas não limitados a:

- a) Toxicidade
- b) Farmacocinética
- c) Comparação da Área Sob a Curva em animais e seres humanos
- d) Saturação da absorção
- e) Farmacodinâmica
- f) Dose Máxima Possível
- g) Dose Limite
- h) Dose terapêutica humana
- i) Resposta Farmacodinâmica em humanos.”

Diferentemente da Anvisa onde as doses não estão especificadas, a *guideline* ICH e europeias descrevem que tais estudos normalmente são conduzidos com 3 doses: baixa, média e alta. As doses devem ser selecionadas baseadas nos parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos obtidos, e comparados, dos ensaios feitos em roedores e humanos (European Medicines Agency 2002a; International Conference on Harmonisation 2008).

As doses média e baixa são utilizadas para fornecer informações adicionais para avaliar a relevância dos resultados do estudo para os seres humanos. Porém algumas questões precisam ser analisadas para a escolha dessas doses em estudos carcinogénicos em roedores, como pode ser visto abaixo (International Conference on Harmonisation 2008):

- Linearidade da farmacocinética e saturação das vias metabólicas;
- Exposição humana e dose terapêutica;
- Resposta farmacodinâmica em roedores;
- Alterações na fisiologia normal do roedor;
- Informações mecanicistas e potenciais efeitos limite;
- Imprevisibilidade em observar progressão toxicológica em estudos de curta duração.

Tradicionalmente, nos estudos de carcinogenicidade destinado aos compostos químicos tem-se escolhido como dose alta a máxima dose tolerada (MDT) como um processo padrão para seleção de doses, além da seleção das doses média e baixa. Para os produtos farmacêuticos, com baixa toxicidade em roedores, o uso da MDT pode resultar na administração de doses excessivamente mais elevadas que a dose clínica pretendida. Sendo assim, esse fato evidenciou preocupações acerca de que a exposição muito acima da exposição destinada a humanos não possa ser relevante na avaliação do potencial risco para humanos, uma vez que essa exposição exacerbada possa alterar a fisiologia da espécie alvo promovendo, assim, resultados que podem não refletir o possível real efeito tóxico em humanos (European Medicines Agency 2002a; International Conference on Harmonisation 2008).

Atualmente, a dose máxima viável por administração oral é considerada como 5% do peso da dieta. A dose limite é fixada em 1500 mg/Kg/dia, essa dosagem é empregue quando a dose máxima recomendada para humanos não ultrapassa 500 mg/dia. Se a dose máxima recomendada para humanos for maior que 500 mg/dia, a máxima dose pode ser aumentada (International Conference on Harmonisation 2008).

8.5. Período de Observação

O período preconizado aos estudos de longa duração é de 24 meses em ratos e, no mínimo 18 meses em ratos e ratinhos (European Medicines Agency 2002a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

O período de observação para os estudos de curto e médio prazo são respectivamente em torno de 6 e 9 meses. A Anvisa não apresenta esses dados em sua literatura (Silva-Lima & J. W. van der Laan 2002).

8.6. Parâmetros a serem avaliados

Os fatores a serem considerados são alterações na função fisiológica que seria necessário para alterar o período de vida normal do animal no estudo ou interferir com a interpretação dos resultados. Tais fatores incluem não mais do que 10% de redução do peso corporal em relação ao grupo controle, toxicidade de órgãos alvos e alterações significativas em parâmetros clínicos patológicos (International Conference on Harmonisation 2008).

Durante o estudo deve-se monitorizar o peso corporal, ingestão de alimento, sinais evidentes de toxicidade, massas palpáveis e oftalmologia. A monitoração dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e da urina devem ser considerados durante e ao final do estudo (European Medicines Agency 2002a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Aproximadamente 25 animais/sexo por grupo serão encaminhados para os testes finais de necropsia, para avaliação histopatológica. É importante fazer os exames histopatológicos dos animais que venham a morrer durante o estudo ou que foram sacrificados antes do tempo necessário por motivo de doença. A incidência de aparecimento de tumores é estatisticamente avaliada baseada na sobrevivência. Ao concluir o estudo todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e necropsiados. A demonstração prévia de efeitos tóxicos pode requerer investigação em áreas específicas (European Medicines Agency 2002a).

A seguinte lista descreve os tecidos e órgão que deverão ser investigados, a análise histopatológica deve ser realizada em todos os animais do estudo (European Medicines Agency 2002a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Todas as lesões macroscópicas, glândula adrenal, aorta, cérebro (incluindo seções do cérebro, cerebelo, e medula/ponte), ceco, colo do útero, glândula de coagulação, cólon, duodeno, epidídimo, olho (incluindo retina), a vesícula biliar (para outras espécies que não rato), glândula harderiana, coração, íleo, jejuno, rins, glândula lacrimal (exorbital), fígado, pulmão, linfonodos (superficial e profunda), glândula mamária feminina, esôfago, pâncreas, ovário, glândula paratireóide, nervo periférico, hipófise, próstata, glândula salivar, vesícula seminal, músculo esquelético, pele, medula espinhal (em três níveis: cervical, médio- torácico e lombar), baço, estômago, testículos, timo, glândula tireoide, traqueia, bexiga, útero (incluindo colo do útero), vagina, e uma secção de medula óssea e/ou aspirado de medula óssea). Alguns achados podem sugerir a necessidade de examinar outros tecidos.

Como informação adicional a *guideline* CPMP/SWP/2877/00 indica a análise histopatológica não só da medula óssea, mas também dos ossos e fêmur, devendo este último incluir também as articulações. Do mesmo modo a mesma *guideline* requer a análise das trompas, para além do ovário (European Medicines Agency 2002a).

As conclusões devem ser apresentadas para cada grupo de tratamento e no grupo controle, mantendo a separação dos sexos, sendo considerado (European Medicines Agency 2002a):

- O número de animais examinados, os dados brutos individuais e exames histopatológicos;
- Número de animais com massas tumorais, identificação do tipo e tecido alvo. Distinguir se o tumor é maligno ou benigno, quando for possível;
- Tempo de cada morte/sacrifício;
- Tempo de aparecimento de qualquer massa tumoral (cl clinicamente documentado) e sua progressão, bem como a histopatologia.

A análise dos dados deve ser direcionada para (European Medicines Agency 2002a):

- Ocorrências de lesões neoplásicas;
- Número de animais com risco examinados;
- Incidência de tumores combinados de origem histogénica comum;
- Incidência de tumores considerados malignos;
- Soma de tumores malignos e benignos no mesmo tecido, quando aplicável;
- Período latente para o aparecimento do tumor;
- Aumento na incidência ou redução da latência de tumores malignos;
- Aumento na incidência de tumores benignos;
- Indução de tumores localizados no local onde foi administrado (injeção);
- Significado biológico do aumento de tumores.

9. Estudos de Toxicidade Reprodutiva

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S5 (R2) - Detection of toxicity to reproduction for medicinal products e toxicity to male Fertility

Anvisa - Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

A primeira *guideline* criada pela ICH referente aos estudos de toxicidade reprodutiva foi aprovado em 1993, intitulada ICH S5A - *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products*. O documento define as estratégias e os protocolos dos estudos destinados a refletir a exposição humana aos fármacos, nas diferentes etapas do ciclo reprodutivo. Com o propósito de adicionar novos conhecimentos sobre toxicidade reprodutiva em machos foi elaborado, em 1995, a *guideline* intitulada ICH S5B - *Toxicity to Male Fertility*, o qual passou por uma pequena revisão no ano de 2000. Em 2005, as *guidelines* foram revistas e fundidas num documento único, a *guideline* ICH S5-R2 - *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility* (International Conference on Harmonisation 2005a).

Um conhecimento prévio do medicamento (aspectos não-clínicos e clínicos) e sua segurança relativamente à reprodução e à fertilidade humana, poderá permitir ao profissional de saúde gerir uma série de situações clínicas e ambulatoriais. A gestão da tomada de decisão levará em consideração tais parâmetros de toxicidade de reprodução para a prescrição correta de medicamentos a mulheres e homens em idade fértil, mulheres gestantes ou que estejam amamentando. Portanto, é de extrema relevância o conhecimento dos riscos reprodutivos associados a cada medicamento durante a prática clínica, evitando assim o comprometimento da

fertilidade e do desenvolvimento pré e pós gestacional. As estratégias de interpretação e utilização dos dados recolhidos sobre toxicidade reprodutiva no labelling do medicamento estão discutidos na *guideline* EMEA/CHMP/203927/2005 aprovada pela Agencia Europeia do Medicamento em 2008 (European Medicines Agency 2008a).

Estão disponíveis, atualmente, inúmeras metodologias com o intuito de auxiliar na investigação do potencial toxicológico reprodutivo de novas moléculas. Os testes realizados em animais tratados durante as várias etapas do ciclo reprodutor refletem melhor a exposição humana durante os períodos equivalentes, e permitem uma identificação mais específica dos riscos associados a sua utilização. Pretende-se pelo conhecimento desses riscos a redução da ocorrência de anomalias fetais humanas bem como de outros efeitos adversos sobre a função reprodutora, tanto quanto possível (International Conference on Harmonisation 2005a; European Medicines Agency 2008a).

O objetivo dos estudos de toxicidade reprodutiva é identificar qualquer efeito que uma substância ativa possua na função reprodutora de mamíferos. Com este propósito, as investigações e interpretações dos resultados devem estar baseados em todos os estudos farmacológicos (primário, secundário e de segurança) e toxicológicos disponíveis. Importantes informações sobre o potencial toxicológico da substância teste podem ser identificadas durante os estudos de dose reiterada, particularmente referentes a fertilidade em machos (European Medicines Agency 2008a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser planejados de acordo com o estado da arte, tendo em consideração conhecimento prévio dos efeitos de classe terapêutica relacionados à reprodução. Os estudos de toxicidade reprodutiva podem ser divididos em esquema experimental e estudos padrão (International Conference on Harmonisation 2005a)

Um planejamento correto do desenho de estudo devem evitar o sofrimento animal, bem como utilizar um número mínimo de animais para alcançar os objetivos globais do estudo não-clínico. Primeiramente determinam-se os esquemas experimentais que possuem a função de uma seleção de prioridades ou pré-triagem, pois podem fornecer informações valiosas e, indiretamente, reduzir o número de

animais utilizados no estudo padrão de toxicidade reprodutiva. Esse estudo pode oferecer a possibilidade de estudar alguns processos de desenvolvimento detalhadamente, por exemplo, para revelar mecanismos específicos de toxicidade, para estabelecer relações dose-resposta, para selecionar "períodos sensíveis", ou para detectar efeitos de metabólitos. No entanto, eles não possuem a complexidade do processo de desenvolvimento e o intercâmbio dinâmico entre função materna e os organismos em desenvolvimento observado nos estudos padrão. É a partir deles que os estudos padrão serão devidamente definidos (International Conference on Harmonisation 2005a)

Como estudo padrão tem-se os testes de fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial (implantação), o desenvolvimento pré e pós natal e o desenvolvimento embriofetal (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013)

A avaliação do risco é baseada em uma avaliação integrada entre os dados não-clínicos e clínicos, o que incluem considerações farmacológicas, farmacocinéticas, outros estudos toxicológicos, além da experiência clínica. No período de desenvolvimento pré-registo os dados mais relevantes que a empresa possuem são os não-clínicos, uma vez que a experiência clínica é inexistente ou limitada na área da reprodução. Para ambos os dados, clínicos e não-clínicos, a avaliação à exposição deve levar em conta a metodologia empregada para a coleta de dados. Com a finalidade de se obter uma avaliação adequada, os estudos devem estar estruturados e ter qualidade científica relevante (European Medicines Agency 2008a).

A combinação de estudos selecionados pela empresa deverá demonstrar a exposição ao medicamento teste em animais adultos férteis e em todas as etapas de desenvolvimento (concepção, gestação, maturidade sexual). O estudo deverá contemplar uma investigação continuada da primeira geração (F1), ciclo de vida após a concepção com exposição a nova molécula, tendo como objetivo a detecção de efeitos tóxicos imediatos ou latentes. A sequência dos estudos e a população visada podem ser vistos abaixo (International Conference on Harmonisation 2005a).

- Antes da concepção: função reprodutiva de fêmeas e machos adultos, desenvolvimento e maturação dos gametas, comportamento durante o acasalamento e fertilização;
- Da concepção à implantação: função reprodutiva de fêmeas adultas, desenvolvimento embrionário de pré-implantação, implantação;
- Da implantação embrionária ao fechamento do palato duro: função reprodutiva de fêmeas adultas, desenvolvimento embrionário, formação de órgãos importantes;
- Do fechamento do palato duro ao final da gestação: função reprodutiva de fêmeas adultas, desenvolvimento e crescimento do feto e dos órgãos;
- Do nascimento ao desmame: função reprodutiva de fêmeas adultas, adaptação do recém-nascido as condições de desenvolvimento extrauterino, desenvolvimento e crescimento pré-desmame;
- Do desmame a maturidade sexual: desenvolvimento e crescimento após o desmame, adaptação a uma vida independente, obtenção de toda a função sexual.

Alguns fatores devem ser considerados quanto a extensão e o alcance dos estudos toxicológicos reprodutivos antes de iniciar os ensaios clínicos. É necessário determinar previamente a natureza do medicamento teste, qual a doença e o grau de severidade, a população que será tratada, a dose, duração do tratamento e o tipo de estudo clínico (Fase I, II ou III) (Bass 2011).

9.1. Recomendações gerais

9.1.1. Modelo Animal

Os animais escolhidos para a realização dos estudos de toxicidade reprodutiva devem ser definidos levando em consideração a saúde, fertilidade, fecundidade, prevalência de anormalidades, morte embriofetal e a consistência existente de cada estudo. Os testes são realizados em mamíferos, e geralmente são

escolhidas as mesmas espécies e estirpes para a realização dos outros estudos toxicológicos. Geralmente o rato é a espécie escolhida entre os roedores, pois é uma espécie prática, com boa comparabilidade entre estudos e sobre o qual existe um vasto conhecimento prévio (International Conference on Harmonisation 2005a; European Medicines Agency 2008a).

Apenas nos estudos de embriotoxicologia uma segunda espécie não-roedora é tradicionalmente escolhida. Geralmente o animal não-roedor escolhido é o coelho por também ser uma espécie prática, ter boa comparabilidade entre estudos e existir vasto conhecimento prévio. Quando for identificado que o coelho não é uma espécie relevante para os estudos, uma outra espécie não-roedora ou uma segunda espécie roedora poderão ser escolhidas, levando sempre em consideração a espécie mais relevante (International Conference on Harmonisation 2005a).

As espécies de animais recomendadas pelas *guidelines* ICH coincidem com as espécies de animais recomendadas pelo guia da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A *guideline* ICH S5-R2 também recomenda o uso de um grupo controle onde os animais receberão apenas o veículo utilizado na administração da substância teste. Quando o veículo causar algum efeito ou afetar a ação da substância teste, é recomendado o uso de um segundo grupo controle. Esses dados não são encontrados no guia da Anvisa (International Conference on Harmonisation 2005a).

O perfil farmacocinético, incluindo a biotransformação, deve permitir uma extrapolação dos resultados de animais para o humano, a fim de avaliar a relevância das espécies selecionadas para os testes. Além de identificar o perfil de biotransformação, a farmacocinética é importante para observar se há a passagem do medicamento ou seu metabólito através da placenta ou leite materno (European Medicines Agency 2008a).

Todas as espécies possuem vantagens e desvantagens na sua utilização como modelos de toxicidade crônica e de reprodução. Ratos e camundongos (em menor escala) são úteis como modelos de uso geral. Os coelhos são muitas vezes utilizados como uma segunda opção em estudos de toxicidade reprodutiva, outras espécies geralmente não são boas como modelos de uso geral e, provavelmente,

são mais utilizados para investigações específicas (International Conference on Harmonisation 2005a).

Entretanto as espécies utilizadas nos estudos de reprodução também possuem suas desvantagens. O rato é sensível a hormônios sexuais, inadequado a agonistas dopaminérgicos, por ser dependente da prolactina como hormônio primário para o estabelecimento e manutenção no início da gravidez, e muito sensível a anti-inflamatórios não-esteroides no final da gravidez. O camundongo possui um metabolismo muito rápido, é sensível ao *stress*, apresenta uma ocorrência elevada de anomalias espontâneas e os fetos são muito pequenos e de difícil observação. O coelho é suscetível a alguns antibióticos, além de existir uma maior dificuldade em analisar os dados coletados do trato gastrointestinal e sinais clínicos. Os cachorros são reprodutores sazonais e possuem fatores de endogamia. O macaco pode diferir cineticamente dos humanos tanto quanto outras espécies e o número de indivíduos são demasiado baixo para detecção de risco, sendo mais utilizado para testes específicos e confirmatórios ao invés de uma investigação geral do risco (International Conference on Harmonisation 2005a).

Outros testes podem ser considerados para analisar a toxicidade reprodutiva. Além dos testes *in vivo* pode ainda recorrer-se a testes *in vitro*. Os testes *in vitro* podem ser realizados a partir de cultura de células de mamíferos, tecidos, órgãos ou organismos celulares. Aliados ao modelo animal, tais estudos podem elucidar mecanismos de ação, fornecer informações importantes e indiretamente reduzir o número de animais utilizados nos estudos (International Conference on Harmonisation 2005a).

Os dados descritos acima referentes à utilização de estudos *in vitro* não foram encontrados no guia da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.1.2. Dosagem e duração do estudo

A escolha da dose mais alta deve ser baseada em dados dos outros estudos realizados (farmacológico, toxicidade crônica e aguda e toxicocinética). Depois de determinar a dose alta, as dosagens mais baixas serão selecionadas seguindo uma sequência decrescente, a determinação dos intervalos dependerão da toxicocinética

e de outros dados toxicológicos. O uso de doses semelhantes aos estudos de dose reiterada permitirá a interpretação de quaisquer potenciais efeitos sobre a fertilidade, quando comparada com a exposição sistêmica. Os estudos de dose reiterada com duração de 2 a 4 semanas fornecem uma aproximação da duração dos estudos de reprodução. Caso não sejam observados efeitos tóxicos no sistema reprodutor, um intervalo de tratamento pré acasalamento de 2 semanas para fêmeas e 4 semanas para machos pode ser utilizado. (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

O intervalo de dose a ser testado deve ser aquele que provoque uma toxicidade materna mínima. Embora seja desejável a determinação da NOAEL, o importante nesse estudo é que o intervalo de doses cause toxicidade suficiente para que seja observada qualquer efeito dose-dependente. Porém se a dose máxima escolhida for excessivamente tóxica, há o risco da perda de qualquer potencial teratogênico e o estudo pode ser classificado como insuficiente. Em estudos onde são utilizadas doses que causem toxicidade materna severa não é possível avaliar os efeitos adversos embriofetais, pois tais efeitos podem ser uma consequência direta do medicamento ou podem ser secundários ao mal estado de saúde materna (European Medicines Agency 2008a).

Para alguns compostos específicos existem alguns fatores que limitam a administração de uma dosagem alta, que são determinados a partir de estudos de toxicidade de dose repetida ou a partir de estudos de reprodução preliminares, que são (International Conference on Harmonisation 2005a):

- Redução no ganho de peso corporal;
- Aumento de ganho do peso corporal, principalmente quando relacionadas à perturbação dos mecanismos homeostáticos;
- Toxicidade desenvolvida a partir de interação do medicamento teste com os órgãos-alvo;
- Hematologia e bioquímica;
- Resposta farmacológica exacerbada, que pode ou não corresponder a um marcador de reações clínicas (por exemplo, sedação, convulsões);

- As propriedades físico-químicas da substância teste ou a dosagem formulada que, aliada à via de administração, pode impor limitações práticas na quantidade a ser administrada. Sobre muitas circunstâncias 1g/kg/dia deve ser adequado como dose limite;
- A cinética pode ser útil na determinação de exposições com dose alta em compostos que possuem baixa toxicidade. Porém, o aumento da dose deve resultar em um aumento da concentração no plasma ou no tecido alvo;
- Aumento acentuado na letalidade embriofetal em estudos preliminares.

9.1.3. Via de administração e frequência

Em geral a via de administração deve ser aquela que será utilizada em humanos (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Uma outra via poderá ser aceita se for demonstrado um perfil farmacocinético similar ou melhor, isto é, que resulte em grande exposição sistêmica. A frequência de administração, geralmente, é de uma vez ao dia, porém deve-se levar em consideração as variáveis cinéticas, sendo necessário aumentar ou diminuir o número de intervenções conforme o perfil do animal (International Conference on Harmonisation 2005a; European Medicines Agency 2008a).

Investigações cinéticas em fêmeas grávidas ou lactantes podem apresentar algumas mudanças quando comparada a fisiologia normal. Sendo assim, o melhor é considerar uma abordagem em duas ou três fases. Os dados obtidos nos estudos cinéticos (muitas vezes de fêmeas não grávidas) fornecem informações sobre a adequação geral da espécie, e podem ajudar na escolha de desenhos de estudo e dosagem. Durante um estudo cinético, investigações podem fornecer a garantia de uma dosagem precisa ou indicar desvios nos marcadores quando comparados com os padrões esperados (International Conference on Harmonisation 2005a).

Os dados sobre frequência e cinética não foram observado no guia da Anvisa.

9.1.4. Desenhos de estudos de toxicidade reprodutiva

Os esquemas experimentais são considerados como quaisquer outros ensaios desenvolvidos em mamíferos, não mamíferos, células, tecidos, órgãos ou cultura de organismos em desenvolvimento, independentemente se são *in vitro* ou *in vivo*. Que estarão integrados aos demais estudos de toxicidade reprodutiva. A Anvisa não cita os esquemas experimentais em seu guia (International Conference on Harmonisation 2005a).

Conforme preconizado pela Anvisa e agência reguladoras internacionais, os estudos padrão de toxicidade reprodutiva são realizados com o objetivo de avaliar principalmente as seguintes fases (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013; Bass 2011).

- Fertilidade (machos e fêmeas) e desenvolvimento embrionário inicial;
- Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna;
- Desenvolvimento embriofetal.

Para a maioria dos medicamentos os três estudos citados são adequados e suficientes. Porém, outras estratégias ou estudos podem ser válidos, mostrando-se mais adequados que os desenhos apresentados. Tal mudança dependerá das peculiaridades de cada caso (International Conference on Harmonisation 2005a).

Há a possibilidade de agrupar as avaliações com roedores em um ou dois estudos. Na abordagem de estudo único, a administração deve se iniciar antes do acasalamento e persistir até o nascimento. A abordagem de dois estudos mais simples consiste em realizar o estudo de fertilidade e associar o estudo de desenvolvimento pré e pós natal com o estudo de desenvolvimento embriofetal (International Conference on Harmonisation 2005b; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.2. Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial – implantação

Tem como objetivo determinar os efeitos toxicológico de uma substância teste previamente ao acasalamento (machos e fêmeas), durante o acasalamento e

durante a implantação embrionária (International Conference on Harmonisation 2005a).

9.2.1. Modelo animal a ser estudado

De acordo com o guia da Anvisa (2013) e o guia europeia ICH S5-R2 (2005a), é necessária no mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos. A proporção adequada de machos e fêmeas deverá ser de 1:1.

Porém a informação está mais detalhada na *guideline* ICH S5-R2 (2005a), onde elucida que devem ser tomadas medidas que permitam a identificação de ambos os progenitores de uma ninhada. Essa opção torna-se a mais segura para obtenção de bons índices de gravidez, bem como evitar uma interpretação incorreta dos resultados.

Também descreve que é necessário observar que o tamanho dos grupos dependerá do número necessário para identificar um efeito tóxico significativo. Para efeitos tóxicos de alta frequência são necessários poucos animais. Para presumir a ausência de um efeito os resultados devem estar de acordo com as variável predefinidas do estudo (*endpoints*), tais como a prevalência em grupos controles ou dispersão ao redor da tendência central (gráfico de tendências). Para eventos raros uma avaliação entre 16 a 20 ninhadas fornece um estudo consistente, se os grupos forem subdivididos será necessário duplicar o número de ninhadas (International Conference on Harmonisation 2005a).

9.2.2. Via de Administração

Conforme o guia brasileiro e *guideline* ICH a via de administração deve ser a mesma pretendida para uso humano (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.2.3. Dosagem e frequência

Conforme descrito no guia brasileiro (2013):

“A seleção de doses é um dos pontos mais críticos nos desenhos dos estudos de toxicidade reprodutiva. A escolha da dose alta deve ser baseada nos dados de todos os estudos disponíveis (farmacologia, estudos de toxicidade aguda/ crônica e toxicocinética). Uma vez determinado a dose alta, as demais doses devem ser selecionadas na seqüência descendente e os intervalos entre elas dependem da cinética e de outros fatores de toxicidade. O período de administração poderá ser embasado por dados de estudos de toxicidade de doses repetidas de, no mínimo, um mês de duração. Caso não sejam observados efeitos tóxicos no sistema reprodutor, um intervalo de tratamento pré-acasalamento de 2 semanas para fêmeas e 4 semanas para machos pode ser utilizado. O tratamento deve ocorrer desde o acasalamento e continuar até a eutanásia para os machos e no mínimo até a fase de implantação para as fêmeas.”

Tais dados também são observados na *guideline* ICH S5-R (2005a).

9.2.4. Período de Observação

Como se encontra descrito no guia da Anvisa (2013) as seguintes funções devem ser observadas:

“Fêmea: Período fértil, implantação e desenvolvimento dos estágios embrionários de préimplantação.

Macho: Fase adulta para avaliação de efeitos funcionais (por exemplo, libido, maturação do esperma epididimal) que possam não ter sido detectados em exames histológicos do órgão reprodutor.”

Tais informações vão de encontro as informações preconizadas pela *guideline* ICH S5-R2 (2005a).

Para além do descrito, ainda ser pode observado no guia ICH S5-R2 que após a gravidez as fêmeas podem ser sacrificadas para dar início à avaliação histopatológica em órgão e tecidos. Os machos também podem ser sacrificados após a copulação, entretanto é necessário confirmação da copulação. No caso de resultados ambíguos, os machos podem ser cruzados com outras fêmeas não tratadas para determinar a sua fertilidade ou infertilidade (International Conference on Harmonisation 2005a).

Quando a exposição ao medicamento cessa ao término da implantação embrionária, pode ser feito o abate de fêmeas entre os dias 13-15 de gestação. Tal medida é considerada adequada com o intuito de observar a fertilidade ou a função

reprodutiva. Pode-se adotar o adiamento do sacrifício dos machos com o objetivo de avaliar a toxicidade do composto no aparelho reprodutor masculino (International Conference on Harmonisation 2005a).

9.2.5. Parâmetros a serem avaliados

O guia brasileiro (2013) descreve que os parâmetros a serem avaliados devem ser:

“Avaliações: maturação de gametas, comportamento no acasalamento, fertilidade, estágio de pré-implantação embrionária, implantação.

Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, alterações de peso corpóreo, consumo de ração, esfregaços vaginais diariamente, pelo menos durante o período de acasalamento, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade.

Ao Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos, preservar órgão com alterações macroscópicas e órgão controle para posterior avaliação; preservar testículos, epidídimo, ovários e útero de todos os animais para possível avaliação histológica; contagem e viabilidade de espermatozoides em epidídimo ou testículo; contagem de corpos lúteos e implantações; fetos vivos e mortos.”

Tais dados também são observados na *guideline* ICH S5-R2 (2005a).

9.3. Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna

Segundo a *guideline* ICH S5-R2 (2005a) esse estudo tem como objetivo detectar efeitos toxicológicos causados pela substância teste em:

- Fêmeas desde o início da gravidez até a lactação;
- Desenvolvimento embrionário;
- Avaliação da ninhada exposta ao medicamento, desde o momento da implantação até o desmame.

A administração de um medicamento durante a gravidez pode gerar vários tipos de efeitos tóxicos no feto (morte), tais efeitos dependerão do período de gestação (European Medicines Agency 2008a):

- Efeito fetotóxico – o período de maior risco começa durante o segundo trimestre da gestação e continua até o final da gestação. Inclui atraso no crescimento ou efeitos adversos na maturação dos órgãos, tanto a nível histológico como funcional;
- Efeitos farmacológicos no neonato - são mais associados com a exposição ao final da gestação ou durante o parto.

9.3.1. Modelo animal a ser estudado

Conforme preconizado no guia Anvisa e na *guideline* ICH S5-R2, é necessário no mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A Anvisa não descreve em seu guia mas a *guideline* ICH S5-R2 complementa que o tamanho dos grupos dependerá do número necessário para identificar um efeito tóxico significativo, conforme descrito no teste de fertilidade e desenvolvimento embrionário (International Conference on Harmonisation 2005a)

9.3.2. Via de Administração

A via de administração deve ser a mesma pretendida para uso humano. Fêmeas devem ser expostas à substância teste desde a implantação até o final da lactação (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.3.3. Dosagem

A escolha da dose deve ser semelhante aos estudos de fertilidade e desenvolvimento embrionário já descrito anteriormente (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.3.4. Período de Observação

Conforme preconizado no guia Anvisa e na *guideline* ICH S5-R2, o período de observação vai desde a gravidez (implantação) até a lactação das fêmeas avaliadas (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Ainda segundo a *guideline* ICH S5-R2, como a manifestações de efeitos provocados pela substância teste nos animais usados pode ser latentes, é recomendado que as observações continuem até a maturidade sexual da nova geração. Essa informação não foi encontrada no guia Anvisa (International Conference on Harmonisation 2005a).

9.3.5. Parâmetros a serem avaliados

Segundo o guia brasileiro (2013), os parâmetros a serem avaliados são:

“Avaliações: Aumento da toxicidade relativa a fêmeas não prenhes, mortalidade pré e pós-natal dos filhotes, crescimento e desenvolvimento alterados, alterações funcionais dos filhotes, incluindo comportamento, maturidade (puberdade) e reprodução.

Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, alteração de peso corpóreo, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade, duração da prenhez e parição.

Ao Final do Estudo: Necropsia e avaliação macroscópica de todos os adultos, implantações, anormalidades. Contagem de fetos vivos e mortos e peso corpóreo ao nascimento, sobrevivência / crescimento / peso corporal pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, desenvolvimento físico, funções sensoriais e reflexas, comportamento da ninhada.”

A avaliação descrita pela Anvisa é a mesma observada na *guideline* ICH S5-R2, porem alguns parâmetros avaliados durante e no final do estudo diferem relativamente ao número à frequência da avaliação. As diferenças estão descritas abaixo, correspondendo a aspetos não referidos pela Anvisa e presentes na *guideline* ICH S5-R2 (International Conference on Harmonisation 2005a):

- Durante o estudo:

- Sinais clínicos e mortalidade, pelo menos uma vez ao dia;
- Peso corporal e alterações no peso corporal, pelo menos duas vezes por semana;
- Ingestão de alimentos, pelo menos uma vez por semana;
- Duração da gravidez;
- Parto.
- Ao final do estudo
 - Preservação e possível avaliação histopatológica de órgão com achados macroscópicos, manter órgãos correspondentes de controle em número suficiente para análise comparativa;

Algumas observações, descritas abaixo, são necessárias para a interpretação do estudo da toxicidade reprodutiva. Porém, estas somente podem ser encontradas nas *guideline* ICH S5-R2 e não no guia Anvisa.

O melhor indicador de desenvolvimento físico é o peso corporal. A obtenção de pontos de referência para o desmame como a abertura do pavilhão auricular, crescimento do pelo, erupção do dente incisivo, etc., está altamente relacionado com o peso corporal da ninhada (International Conference on Harmonisation 2005a).

A *guideline* ICH S5-R2 sugere a utilização de dois pontos de referência para o tempo de pós-desmame, que são a abertura vaginal em fêmeas e a clivagem da glândula preputial (*balanopreputial gland*) em machos. Este último parâmetro está associado com o aumento dos níveis de testosterona no animal e com isso o início da maturação sexual, porém a sua avaliação é necessário pois nesta fase ainda não houve o aparecimento dos testículos. Recomenda-se que o peso corporal seja registrado para determinar se as diferenças entre os grupos (exposição – controle) são específicas ou relacionadas com o crescimento normal (International Conference on Harmonisation 2005a).

A *guideline* ICH S5-R2 sugere ainda que procedimentos experimentais podem ser conduzidos. Pode-se selecionar um macho e uma fêmea de cada ninhada para realizar teste funcionais e comportamentais individualizados. Os dados gerados serão utilizados para avaliação da função reprodutiva através da análise cruzada das informações de diferentes testes. Geralmente esses testes são realizados com

conjuntos separados de animais e não individualizado acima proposto. A escolha dos testes para avaliação da função reprodutiva dependerá da combinação de testes e os recursos disponíveis da empresa (International Conference on Harmonisation 2005a).

A Anvisa (2013) recomenda somente que um macho e uma fêmea por ninhada devam ser selecionados para acasalamento na idade adulta com objetivo de avaliar a sua competência reprodutiva. Mas não faz uma explicação mais minuciosa sobre o tema, como foi realizado na *guideline* ICH S5-R2.

9.4. Desenvolvimento embrionário

Esse estudo tem como objetivo detectar efeitos tóxicos em fêmeas grávidas e no desenvolvimento do embrião e do feto após exposição da fêmea à medicação teste, desde o momento da implantação até o fechamento do palato duro. Os efeitos avaliados neste estudo são (International Conference on Harmonisation 2005a):

- Aumento da toxicidade quando comparadas com fêmeas não grávidas;
- Morte embrionário;
- Alterações no crescimento;
- Alterações estruturais (teratogênese).

9.4.1. Modelo animal a ser estudado

Usualmente são escolhidos duas espécies para os testes. Uma espécie roedora, preferencialmente o rato e uma espécie não-roedora, preferencialmente o coelho. O uso de outras espécies deverá ser justificado (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Conforme preconizado somente na *guideline* ICH S5-R2, o tamanho dos grupos dependerá do número necessário para identificar um efeito tóxico significativo, conforme descrito no teste de fertilidade e desenvolvimento embrionário (International Conference on Harmonisation 2005a)

9.4.2. Via de Administração

A mesma pretendida para uso humano (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.4.3. Dosagem

Os critérios para escolha da dose deve ser semelhante aos estudos de fertilidade e desenvolvimento embrionário já descrito anteriormente (International Conference on Harmonisation 2005a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

9.4.4. Período de Observação

Segundo a ICH, o período de tratamento compreende desde o momento da implantação até o fechamento do palato duro do feto (International Conference on Harmonisation 2005a).

Ainda segundo o guia Anvisa, as fêmeas devem ser submetidas à eutanásia e examinadas um dia antes do parto. Todos os fetos devem ser examinados quanto à viabilidade e alterações (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Os dados descritos acima também estão listados na *guideline* ICH S5-R2 (2005a), porém fazem parte da seção procedimentos experimentais. Entretanto maiores informações podem ser observadas na *guideline* ICH S5-R2, que não são encontradas no guia Anvisa.

Quando for utilizadas técnicas separadas para análise de tecidos moles e alterações esqueléticas, sugere-se a alocação de 50% dos fetos de cada ninhada para o exame esquelético. Na espécie roedora, rato, será necessário examinar alterações viscerais em no mínimo 50% dos fetos, independente da técnica usada. Na espécie não-roedora, coelho, ao utilizar a técnica de microdissecação a fresco para análise de alterações em tecidos moles, será necessário avaliar os tecidos

moles e alterações esqueléticas em 100% dos fetos (International Conference on Harmonisation 2005a).

É possível relatar todos os achados empregando diferentes técnicas laboratoriais em uma única espécie a fim de detetar padrões de anormalidade. Em alguns casos a realização destes testes não são necessários nos grupos que recebem a dose baixa ou intermediária, isto só acontecerá se não forem detetadas diferenças significativas entre os dados do grupo de dose alta e o grupo controle. É aconselhável, no entanto, o armazenamento de amostras para futuras avaliações confirmatórias (International Conference on Harmonisation 2005a).

9.4.5. Parâmetros a serem avaliados

Segundo a Anvisa (2013):

“Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, alteração de peso corpóreo, consumo de ração, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade.

Ao final do estudo: necrópsia com avaliação macroscópica de todos os adultos, contagem de corpos lúteos, número de implantações que resultaram em fetos vivos e mortos, peso corpóreo individual fetal, anormalidades fetais, avaliação da placenta, preservar órgãos com achados macroscópicos para possíveis avaliações histopatológicas e órgãos correspondentes em quantidade suficiente para comparação (controle).”

A avaliação descrita pela Anvisa é a mesma observada na *guideline* ICH S5-R2, porém os alguns parâmetros avaliados durante e ao final do estudo diferem relativamente no número de parâmetros avaliados e na frequência em que devem ser realizados. As diferenças traduzidas na ausência dos requisitos listados podem ser observadas abaixo (International Conference on Harmonisation 2005a):

- Durante o estudo:
 - Sinais clínicos e mortalidade, pelo menos uma vez ao dia;
 - Peso corporal e alterações no peso corporal, pelo menos duas vezes por semana;
 - Ingestão de alimentos, pelo menos uma vez por semana;

9.5. Interpretação dos dados

Segundo a Anvisa (2013), as principais observações são:

“Nos estudos é necessário que os animais tenham idade, peso e paridade comparáveis.

Lactação: Em casos de avaliação de riscos para lactentes (cujas mães foram expostas à droga durante a lactação), deverão ser considerados dados não clínicos, farmacocinéticos, e às vezes clínicos. As avaliações não clínicas são compostas de: transferência para o leite, desenvolvimento de filhotes lactentes, características físicoquímicas e farmacocinéticas da substância, quantidade absorvida estimada e permanência da substância no leite.”

Os parâmetros descritos acima são avaliados nos estudos de toxicidade reprodutiva conduzidos conforme *guideline* ICH S5-R2 (2005a).

Segundo a *guideline* EMEA/CHMP/203927/2005, no final do estudo deve ser justificado a ausência dos estudos não-clínicos, a falta de algum teste do estudo, ou se os dados obtidos são insuficientes para avaliação da toxicidade reprodutiva. Se a avaliação dos dados obtidos não indicar efeitos tóxicos direta ou indiretamente, com exposição sistêmica adequada, e não indicar efeitos relevantes em outros estudos farmacológicos, toxicológicos, tal poderá permitir a finalização do processo de avaliação. Caso exista um efeito tóxico esperado relacionado com a classe terapêutica do fármaco, e o mesmo não for observado durante o estudo, pode ser necessário uma investigação mais aprofundada (European Medicines Agency 2008a).

Ainda segundo essa *guideline*, se for evidenciada a existência de toxicidade reprodutiva, o processo de avaliação deve continuar como descrito abaixo, a fim de avaliar o inerente grau de preocupação (European Medicines Agency 2008a):

- Aspectos gerais
 - Reconhecimento do efeito: diferenças estatisticamente significativas, plausibilidade biológica, reprodutibilidade, mecanismo de ação específico do fármaco ou da espécie animal, a relação de um metabolito específico do animal, e/ou da relação clara de dose-resposta;

- Concordância entre espécies: se o mesmo efeito é observado em mais do que uma espécie. Essa relação é mais provável de ser identificada para alterações estruturais ou mortalidade, pois estes parâmetros são estudados em diversas espécies;
- Tipo do efeito: efeitos morfológicos (de maior interesse para determinar preocupação toxicológico) e efeitos gerais.
- Multiplicidade dos efeitos: refere-se à observação de dois ou mais efeitos com parâmetros biológicos relacionados.
- Efeitos tóxicos em vários estágios do processo reprodutivo;
- Informação adicional de outros estudos;
- Eventos raros: um aumento da frequência de eventos raros em animais expostos no estudo pode aumentar a preocupação com a toxicidade reprodutiva em seres humanos. Eventos raros devem ser mencionados no plano de gestão de risco, pois podem levar a um sinal.
- Espectos específicos
 - Dados de estudos de toxicidade reprodutiva e/ou a partir de estudos de toxicidade por dose repetida podem sugerir efeitos tóxicos sobre a fertilidade. Em estudos de toxicidade de doses repetidas, tais efeitos podem ser: alterações da função endócrina ou alterações histopatológicas das gônadas ou órgãos genitais, que podem ser detetados em roedores e não roedores.
 - Toxicidade materna;
 - Relação de resposta à dose;
 - Toxicidade reprodutiva ligada ao efeito farmacológico;
 - Relação da razão exposição animal e humana;
 - Histórico recente de dados de controlo da mesma estirpe e de preferência a partir do laboratório em que o estudo foi realizado.

Como já descrito anteriormente, pode-se realizar avaliação de toxicidade reprodutiva ao término da implantação embrionária, isto é, o sacrifício de fêmeas entre os dias 13-15 (respectivamente rato e coelho) de gestação, com a finalidade de observar a fertilidade ou a função reprodutora. Para a detecção de efeitos tóxicos

sobre a fertilidade realiza-se o sacrifício de fêmeas entre os dias 20-21 (respectivamente rato e coelho) de gestação, com a finalidade de obter informação sobre a morte do embrião em estágio tardio da gravidez, morte fetal e anomalias estruturais. Como pode ser visto abaixo na Figura 8 (International Conference on Harmonisation 2005a).

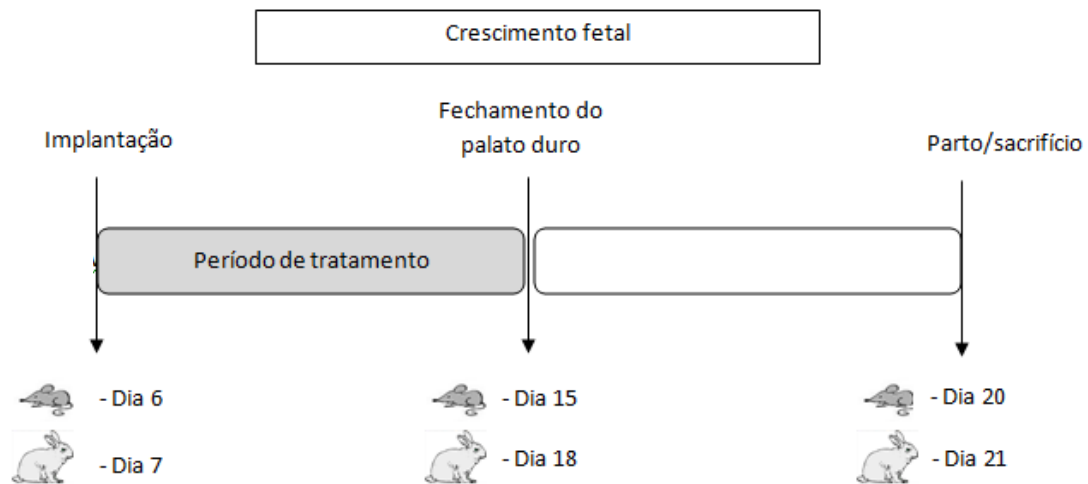


Figura 8: Representação período de administração do fármaco teste - sacrifício (International Conference on Harmonisation 2005a)

De acordo com a Anvisa, as considerações sobre os estudos de toxicidade reprodutiva que devem ser concluídos anteriormente à inclusão de homens, mulheres sem e com potencial para engravidar nas fases de Pesquisa Clínica são (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

Homens: podem ser incluídos em Pesquisas Clínicas Fase 1 e 2 anteriormente à condução de estudos de fertilidade em machos desde que uma avaliação dos órgãos de reprodução já tenha sido realizada nos estudos de toxicidade de doses repetidas. Estudos de fertilidade em animais machos devem ser concluídos anteriormente à iniciação de Pesquisas Clínicas Fase 3.

Mulheres sem potencial para engravidar (em menopausa há pelo menos 1 ano, estéreis permanentes): podem ser incluídas em Pesquisas Clínicas sem estudos de toxicidade reprodutiva desde que tenha ocorrido a avaliação dos órgãos reprodutivos nos estudos de toxicidade de doses repetidas.

Mulheres com potencial para engravidar, utilizando métodos contraceptivos podem ser incluídas em Estudos Clínicos de fase I e II sem os estudos de toxicidade de desenvolvimento (por exemplo, embriotoxicidade) desde que se configure uma das circunstâncias citadas abaixo:

- 1- Administração da substância teste em estudo por até duas semanas sob intensivo controle do risco de gravidez (por meio de: teste de gravidez – β HCG, métodos de controle altamente eficazes e inicialização do estudo após período menstrual confirmado), ou;
- 2- Predominância da doença em mulheres e o objetivo do estudo clínico não pode ser efetivamente conhecido sem a inclusão dessa população e há intensivo controle do risco de gravidez conforme métodos apresentados acima, ou;
- 3- Conhecimento do mecanismo de ação da substância teste, tipo de substância teste, extensão da exposição fetal ou dificuldade da condução de estudos de toxicidade de desenvolvimento em modelo animal apropriado, ou;
- 4- Existência de dados preliminares de toxicidade reprodutiva em duas espécies, com intensivo controle do risco de gravidez conforme métodos apresentados acima, em estudos de curta duração (até 3 meses) e até 150 sujeitos de pesquisa.”

Ainda segundo a Anvisa, para as demais situações, os estudos de embriotoxicidade devem estar concluídos antes da inclusão dessa população em estudos clínicos. As mulheres com potencial para engravidar podem ser incluídas nos estudos clínicos iniciais (Fase 1 e 2) anteriormente à condução de estudos de fertilidade desde que tenham sido realizados avaliação de órgãos reprodutivos em estudos de toxicidade de doses repetidas. Os estudos de desenvolvimento pré e pós-natal deverão ser finalizados e apresentados à autoridade reguladora no dossiê do processo de registro do medicamento (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Tais orientações constam também na *guideline* ICH M3-R2. Esta *guideline* ainda descreve as condições em que mulheres grávidas podem ser incluídas nos estudos clínicos. Tal pode ocorrer somente se todos os estudos de toxicidade reprodutiva (com fêmeas) e os estudos de genotoxicidade estiverem finalizados. Também é necessário que a avaliação do estudo de segurança sobre exposição prévia em humanos esteja finalizada. Tais dados não são descritos no guia brasileiro (International Conference on Harmonisation 2009a).

Os resultados globais dos estudos de toxicidade de reprodução e sua interpretação (Figura 7) irão ser utilizados para a elaboração da literatura que é facultada ao doente e ao médico. Assim como designa no Brasil e na Europa, ou seja, folheto informativo/bula (EU, Brasil) ou Resumo das características do

Medicamento/Relatório Técnico (EU/Brasil). Nestes documentos existem itens específicos para aconselhar sobre utilização do medicamento na gravidez (item 4.6 do RCM, item 3 da bula). A necessidade de contra-indicação na gravidez será também decorrente dos resultados da toxicidade de reprodução tendo em linha de conta a possibilidade de evitar a terapêutica durante a gravidez (European Medicines Agency 2008a)

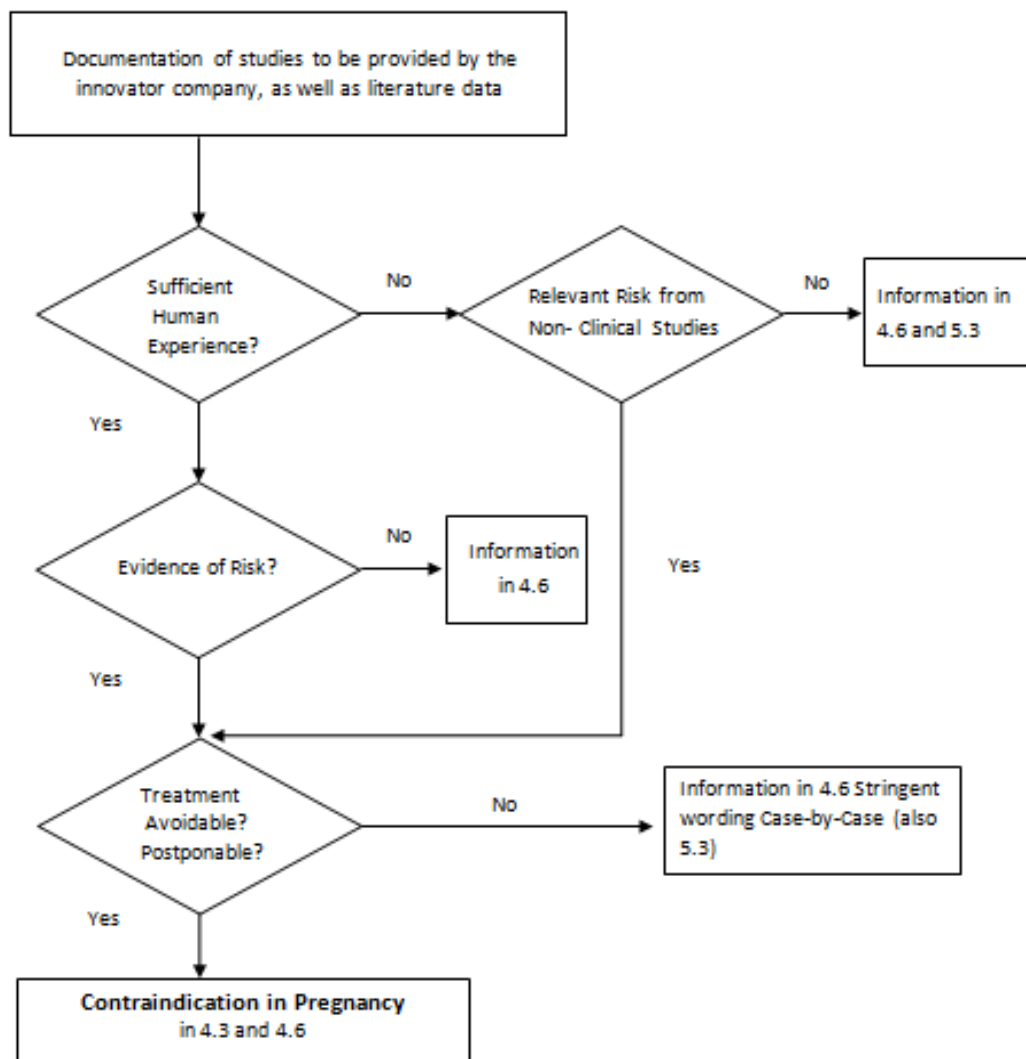


Figura 9: Diagrama de tomada de decisão sobre contra indicação em mulheres grávidas (European Medicines Agency 2008a).

10. Estudos nos quais a Descendência é Estudada - Desenvolvimento não-clínico de Medicamentos Pediátricos (estudos em animais juvenis)

Desde 1997 as Autoridades Reguladoras na Europa e nos Estados Unidos iniciaram um conjunto de discussões no sentido de implementar medidas que obrigassem a Indústria Farmacêutica a incluir, no desenvolvimento de novas terapêuticas, estudos pediátricos, caso a indicação exista naquela população. Tal iniciativa foi devida à constatação de que existia uma carência de medicamentos desenvolvidos apropriadamente para a sua utilização em pediatria. Na Europa, é atualmente obrigatória a elaboração de um plano de investigação pediátrico (PIP) para cada medicamento em desenvolvimento. A necessidade de elaborar estudos clínicos em pediatria levantou a discussão sobre a oportunidade de incluir no desenvolvimento não-clínico a elaboração de estudos em animais jovens como modelo dos diferentes grupos etários pediátricos.

A maioria dos medicamentos disponíveis no mercado, usados em população pediátrica, não possui estudos formais que indiquem a sua utilização em crianças. A aprovação de medicamentos para população pediátrica requer uma avaliação especial do risco benefício, a avaliação deve ser baseada nos dados de segurança e farmacocinética dos estudos não-clínicos e clínicos. Em alguns casos quando os dados são considerados insuficientes é necessário realizar estudos adicionais em animais jovens (European Medicines Agency 2008b)

Como forma de adicionar informações aos estudos de toxicidade reprodutiva, e na sequência das medidas tomadas relativas aos medicamentos pediátricos, em 2008 foi aprovado pela EMA uma *guideline* referente aos estudos em animais jovens intitulado EMEA/CHMP/SWP/169215/2005 - *Guideline on the Need for Non-clinical Testing in Juvenile Animals of Pharmaceuticals for Paediatric Indications*. Esse documento define o período de tratamento que deve ser usado em animais jovens com o intuito de melhor refletir a exposição pediátrica aos fármacos e avaliar o risco associado ao uso nessa população (European Medicines Agency 2008b).

O objetivo do estudo não clínico em animais jovens é obter informações sobre diferenças potenciais no perfil de segurança observado em adultos. Estudos em animais jovens geralmente são usados para investigar dados que em alguns casos são considerados inadequados, não éticos e seguros em população pediátrica quando tais dados são extrapolados de estudos em adultos (European Medicines Agency 2008b).

Com os dados dos estudos realizados em animais e humanos, ambos adultos, é possível prever as reações adversas que podem ocorrer em órgãos/tecidos em desenvolvimento. Estudos em animais jovens podem ser justificados se houver a necessidade de investigar um efeito específico, estudar a reversibilidade, agravamento de resultados esperados, bem como para estabelecer fatores de segurança. O estudo em animais jovens pode ser realizado conjuntamente com testes de reprodução, (peri-pós natais) cabendo à empresa definir qual o melhor desenho de estudo para os estudos de toxicidade (European Medicines Agency 2008b).

Existem inúmeros medicamentos que possuem diferenças no perfil de segurança quando se compara a população adulta e pediátrica, podendo nesses casos os estudos em animais jovens ser indicados. As diferenças podem ser qualitativas, quantitativas, imediatas ou latentes, tais como diferenças na farmacocinética/dinâmica, desenvolvimento e função de órgãos alvos, expressão de recetores alvo, maturação do sistema imune, desenvolvimento corporal, entre outros (European Medicines Agency 2008b).

Geralmente os dados recolhidos em estudos não-clínicos com animais e estudo clínicos em humanos, ambos adultos, são utilizados para dar suporte à indicação pediátrica. Porém, esses dados nem sempre predizem adequadamente as reais diferenças no perfil de segurança em todos os grupos pediátricos. Tais diferenças poderão ocorrer especialmente em sistemas imaturos como o cérebro, sistema pulmonar, rins, sistema reprodutivo, sistema imune, esquelético e em órgão e tecidos que estão associados com a farmacocinética do produto (European Medicines Agency 2008b).

Os resultados preditivos de estudos não-clínicos e clínicos são a chave para definir a necessidade de estudos em animais jovens antes de estudo clínicos em

população pediátrica. A possibilidade de extrapolação para pediatria dos dados recolhidos em adultos depende da idade do grupo pediátrico. Geralmente relevância da extrapolação é mais baixa em prematuros, recém-nascidos, crianças pequenas de idade inferior a 2 anos (European Medicines Agency 2008b).

A relevância da extrapolação dos dados toxicológicos em adultos para população pediátrica aumenta a medida que aumenta a idade, sendo a mais alta em adolescentes. Isso se deve pois o desenvolvimento dos principais sistemas é dependente da idade, como pode ser visto abaixo (European Medicines Agency 2008b):

- Sistema nervoso: desenvolvimento até a idade adulta;
- Sistema reprodutivo: desenvolvimento até a idade adulta;
- Sistema pulmonar: desenvolvimento até os dois anos de idade;
- Sistema imune: desenvolvimento até os 12 anos;
- Sistema renal: desenvolvimento até 1 ano de idade;
- Sistema esquelético: desenvolvimento até a idade adulta
- Órgãos e/ou sistemas envolvidos em absorção e metabolização de fármacos: desenvolvimento da biotransformação de enzimas até a adolescência.

Os seguintes pontos clínicos e não-clínicos devem ser considerados quando se avalia a necessidade de estudos em população jovem (European Medicines Agency 2008b):

- Idade da população alvo;
- Doenças que afetam somente ou predominantemente população pediátrica;
- Duração do tratamento com o fármaco;
- Identificação de órgão e/ou tecidos alvos e o tempo de desenvolvimento do sistema em análise;
- Farmacodinâmica primária em órgão e tecidos com desenvolvimento pós-natal significativo;
- Dados relevantes de farmacocinética;
- Existência de dados relevantes em humanos e animais adultos (clínicos e não-clínicos);

- Observação de reações adversa ou irreversíveis;
- Mecanismo de ação;
- Dados relevantes em animais jovens observados em estudos com fármacos da mesma classe terapêutica.

10.1. Modelo Animal e duração

A escolha da idade do animal e da duração do estudo dependerá do estadió de desenvolvimento do sistema/órgão alvo em que se espera que o princípio ativo vá atuar, levando em consideração a idade e a duração da exposição da população alvo. A espécie mais relevante deve ser escolhida com base em dados farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos. As espécies tradicionalmente escolhidas para esse estudo pode ser o rato (espécie roedora – uso preferencial) ou o cão (espécie não-roedora) (European Medicines Agency 2008b).

Quando a preocupação incide na ocorrência de reações adversas em sistemas com um longo período de desenvolvimento o estudo em animais juvenis abrangerá o período desde o nascimento até a idade adulta, isto é, um estudo de longa duração aproximadamente de 13 semanas em ratos e 9 meses em cão. Segundo a *guideline* M3-R2 quando a população pediátrica é a população alvo (primária) pode-se realizar um estudo de longa duração (uso crônico) cobrindo todo o desenvolvimento do animal, sendo 12 meses em cão e 6 meses em roedor (European Medicines Agency 2008b; International Conference on Harmonisation 2009a)

Para órgãos e sistemas/órgãos com um período breve de desenvolvimento, o período de tratamento ficará restrito ao período de desenvolvimento do órgão. O teste de toxicidade pediátrica é normalmente realizado usando uma só espécie, com indivíduos de ambos os sexos (European Medicines Agency 2008b).

O uso de modelos de estudo *in vitro* utilizando tecido animal juvenil ou modelos específicos de doenças em animais jovens também podem ser consideradas para o estudo de toxicidade em órgãos-alvo (esquemas experimentais) (European Medicines Agency 2008b).

10.2. Via de administração

Idealmente, a via de administração deve ser a mesma pretendida para humanos, a menos que estudos em animais adultos indiquem uma via mais relevante. Caso outra via seja escolhida, a mesma deverá ser justificada (European Medicines Agency 2008b).

10.3. Farmacocinética e toxicocinética

Dados de farmacodinâmica contribuem para a avaliação da relevância do modelo animal na avaliação do risco. É conhecido que a colheita de amostras de sangue para a avaliação do perfil cinético em animais jovens pode ser difícil. Sendo assim, é possível recolher amostra de um pool com sangue de vários animais para obter uma estimativa das características cinéticas básicas (C_{max} e AUC). Dados de toxicocinética podem ser usados para confirmar níveis de exposição apropriados em diferentes grupos de tratamento (European Medicines Agency 2008b).

10.4. Dosagem

Utiliza-se três doses: baixa, intermediária e alta. Recomenda-se que as doses escolhidas utilizando as concentrações da parte inferior da curva dose/resposta estabelecida para animais adultos. Para fazer uma ponte com os dados recolhidos em animais adultos poderá ser estabelecido uma dose comum que resulte em uma exposição sistêmica similar, preferencialmente um intervalo perto da NOAEL ou NOEL deve ser incluído nos estudos em animais jovens. A dose alta deve desenvolver uma toxicidade detetável, mas que não resulte em uma toxicidade efetiva pois poderia dificultar a avaliação. A menor dose deve preferencialmente resultar em uma exposição sistêmica (não-clínica) similar a exposição clínica pretendida para essa população. Uma dose intermediária não será necessária caso a diferença entre a dose alta e baixa demonstre diferenças pequenas de toxicidade.

A EMA não exige que a dose mais alta induza toxicidade, o que difere da *guideline* produzida pela FDA (European Medicines Agency 2008b).

10.5. Parâmetros a serem avaliados

Deve-se monitorizar os efeitos globais toxicológicos no crescimento e desenvolvimento do animal exposto ao medicamento, tais como índice de crescimento, índices externos de maturação sexual, peso corporal, sinais físicos, peso dos órgãos, exames macro e microscópicos, exames laboratorial (hematológicos e bioquímicos) e exames histopatológicos (European Medicines Agency 2008b):

- **Avaliação neurotóxica**
Monitorização dos domínios funcionais do sistema nervoso central que incluem, mas não restringe, avaliação do reflexo ontogênico, função sensorial motora, locomoção, reação, comportamento social e aprendizado e memória.
- **Avaliação Imunotóxica**
Esse estudo será realizado somente se houver dados que comprovem a sua necessidade. O estudo deve ser baseado segundo a *guideline* ICH S8 - *Note for Guidance on Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals*.
- **Avaliação Nefrotóxica**
Esse estudo será realizado somente se houver dados que comprovem a sua necessidade. Os métodos validados deverão monitorar parâmetros funcionais chave em urina.

Em qualquer das situações no planeamento de estudos em animais juvenis deverá ser tida em linha de conta a comparação do desenvolvimento dos órgãos em análise com os na criança a fim de manter a relevância do modelo utilizado. Uma mensagem que é relevante na *guideline* EMEA/CHMP/SWP/169215/2005 é que a condução de estudos em animais juvenis deverá ser considerada caso a caso, no que respeita à sua necessidade e protocolo experimental. Se necessários, em geral estes estudos devem ser conduzidos antes dos ensaios clínicos em pediatria e

devem sempre constar no plano de Investigação Pediátrica submetido à EMA (European Medicines Agency 2008b).

11. Estudos de Tolerância Local

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

CPMP/SWP/2145/00 - Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products

EMA/CHMP/SWP/708666/2010 - Concept paper on the need for revision of the *Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products*

Anvisa – Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

A primeira *guideline* sobre estudos de tolerância local foi publicada pela EMA no ano de 2001, intitulada CPMP/SWP/2145/00 – *Note for Guidance on Non-Clinical Local Tolerance testing of Medicinal Products*, estando até o presente momento em vigência. No entanto, no ano de 2011 foi publicado pela EMA, EMA/CHMP/SWP/708666/2010 - *Concept paper on the need for revision of the Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (CPMP/SWP/2145/00)*, que essa *guideline* entraria em revisão pela necessidade de adequá-la aos novos conhecimentos e tecnologias desenvolvidos aos longos dos anos. Porém a revisão ainda não se encontra finalizada (European Medicines Agency 2001; European Medicines Agency 2011b).

O objetivo dos estudos de tolerância local é avaliar se o medicamento (fármaco e excipientes) é tolerado nos locais onde será administrado clinicamente. Os testes deverão avaliar quaisquer efeitos mecânicos da administração ou ações meramente físico-químicas do produto que podem ser distinguidas de efeitos toxicológicos ou farmacodinâmicos (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Os testes de tolerância local devem ser realizados nos locais que entrarão em contato com o fármaco e também em locais que poderão entrar em contato acidentalmente ou devido à exposição inevitável ao produto. O local de administração pode ser o mesmo órgão ou tecido, que se destina a ser o alvo terapêutico (por exemplo, a pele para produtos dermatológicos, o olho para medicamentos oftalmológicos), ou os locais afastados do alvo terapêutico (por exemplo, sistemas transdérmicos, medicamentos administrados por via endovenosa). Segundo a *guideline* ICH M3-R2 e o guia Anvisa os testes de tolerância local devem estar integrados aos estudos gerais toxicológicos, uma vez que estudos independentes não são recomendados em linha com a política de redução de estudos animais (3Rs) (European Medicines Agency 2001; International Conference on Harmonisation 2009a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

No planejamento de ensaios de tolerância local, as seguintes informações devem ser observadas (European Medicines Agency 2001):

- As propriedades físico-químicas do produto: por exemplo, para evitar sofrimentos desnecessários nos animais, produtos que são corrosivos pela natureza do seu pH devem ser excluídos de estudos em animais vivos;
- Os estudos de farmacodinâmica, os dados toxicológicos e farmacocinéticos para a substância ativa, ou a combinação de substâncias ativas, bem como dos excipientes.

Os testes de toxicidade sistêmica são indicados para os casos onde não houve estudos anteriores de avaliação da toxicidade. Devem empregar uma via de administração que promova uma exposição sistêmica adequada, incluindo parâmetros necessário que revelem a existência de toxicidade em órgão/tecido alvo. Esses estudos não serão necessários nos casos em que estudo toxicológicos já foram realizados anteriormente ou onde a absorção do produto é considerada baixa o suficiente para excluir a possibilidade de efeitos sistêmicos (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Para as administrações intravenosas com microdoses, incluída pelos estudos de toxicologia oral, a avaliação de tolerância local não se justifica. Se for usado um

novo veículo na formulação do composto deverão ser realizados testes de tolerância local para o veículo. Para produtos administrados por via parenteral, a avaliação de tolerância local em locais de injeção acidental, quando apropriado, devem ser conduzidos antes da exposição de um grande número de pacientes (por exemplo, ensaios clínicos de Fase III) (International Conference on Harmonisation 2009a)

A análise final dos resultados deverá incluir a discussão sobre a adequação do teste de tolerância local e sobre o significado dos resultados para a utilização clínica do produto. Os testes de tolerância local podem ser parte de outros estudos toxicológicos, desde que o fármaco teste seja administrado sob condições adequadas (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Nos casos em que não houve uma avaliação toxicológica prévia do fármaco, estudos específicos de avaliação de toxicidade deverão ser conduzidos. Estes estudos devem empregar uma via de administração adequada, que resulta na exposição sistêmica, além de incluir investigações necessárias para revelar sinais de toxicidade em órgãos alvo. Geralmente, estudos para a avaliação da toxicidade sistêmica não serão exigidos nos casos em que (European Medicines Agency 2001):

- Absorção do produto é tão baixa que a possibilidade de efeitos sistêmicos pode ser excluída;
- O produto é absorvido, mas a sua toxicidade sistêmica foi previamente investigada.

Para as administrações intravenosas com microdoses, incluída pelos estudos de toxicologia oral, a avaliação de tolerância local não se justifica. Se for usado um novo veículo na formulação do composto deverão ser realizados testes de tolerância local para o veículo. Para produtos administrados por via parenteral, a avaliação de tolerância local em locais de injeção acidental, quando apropriado, devem ser conduzidos antes da exposição de um grande número de pacientes (por exemplo, ensaios clínicos de Fase III) (International Conference on Harmonisation 2009a).

11.1. Modelo Animal

Segundo a Anvisa (2013), a escolha do modelo animal dependerá:

“A escolha da espécie dependerá do problema a ser investigado e ao modelo considerado adequado. Normalmente, apenas uma espécie deve ser avaliada para cada tipo de ensaio. Onde dois ou mais parâmetros toxicológicos estão sendo investigados (por exemplo, tolerância ocular e sensibilização da pele), as espécies adequadas para cada ensaio deverão ser utilizadas.”

O mesmo pode ser observado nas *guidelines* CPMP/SWP/2145/00 (2001).

A proposta de revisão da *guideline* CPMP/SWP/2145/00, abordada no documento EMA/CHMP/SWP/708666/2010, está focada principalmente na escolha do modelo de estudo a ser escolhido nos testes de tolerância local. De acordo com a *guideline* EMA/CHMP/SWP/708666/2010 vários sistemas de testes *in vitro* estão sendo utilizados atualmente para diferentes objetivos no desenvolvimento dos ensaios não-clínicos. Desta forma, sempre que possível, os estudos em modelos animais (*in vivo*) devem/podem ser substituídos por ensaios *in vitro* validados (European Medicines Agency 2011b).

11.2. Via de administração

Segundo a Anvisa (2013):

“Ensaio de tolerância local devem ser realizados com a preparação desenvolvida para utilização no ser humano, utilizando o veículo e/ou os excipientes no tratamento do grupo controle. Controles positivos/ substância referência pode ser incluída, sempre que necessário. A frequência e a duração da administração aos animais deverão ser determinadas pela proposta de administração, em condições de uso clínico. Contudo, o período de aplicação não deve ser superior a quatro semanas. Investigação de tolerância local após a administração acidental pode ser feita por estudos de dose única.

A via de administração deve ser selecionada de acordo com o previsto para o ser humano. A anatomia e fisiologia do local de aplicação devem ser consideradas. Testes em diferentes vias de administração no mesmo animal são permitidos, desde que os testes não influenciem uns aos outros, e na medida em que permite tolerância sistêmica. Administração contralateral da

preparação controle é aceitável quando a confiabilidade do estudo não for comprometida.”

A mesma proposta pode ser observada nas *guidelines* CPMP/SWP/2145/00 (2001).

11.3. Dosagem

A Anvisa (2013) sugere nos casos em geral que deva ser administrado uma dose com a real concentração de substância ativa utilizada em seres humanos. Podendo ser ajustada através da variação da frequência de administração. O mesmo também foi proposto na *guidelines* CPMP/SWP/2145/00 (2001).

A *guideline* CPMP/SWP/2145/00 complementa essa informação descrevendo que a preparação do fármaco administrado nos animais deve ser a mesma que será usada em humanos usando o mesmo veículo ou excipiente do grupo controle, quando estes forem incluídos nos estudos (European Medicines Agency 2001).

O guia Anvisa (2013) não apresenta tais dados.

11.4. Reversibilidade

Conforme observado no guia da Anvisa (2013) e na *guideline* CPMP/SWP/2145/00 (2001), a avaliação da reversibilidade das lesões locais deverá ser incluída quando relevante.

11.5. Bem-estar animal

Como descrito no guia da Anvisa e na *guideline* CPMP/SWP/2145/00, em caso de forte irritabilidade em testes com modelos menos sensíveis a mudança para modelos mais sensíveis deve ser cuidadosamente considerada. Devem ser tomados, também, cuidados para minimizar a exposição dos animais a dores irritantes, encerrando as experiências no ponto onde são observadas reações adversas graves e não continuar os estudos a fim de fornecer resultados essenciais

para a avaliação dos riscos (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

11.6. Teste de tolerância para vias específicas de administração

Além da via de administração tópica existem outras vias de administração, tais como via ocular, parenteral, retal e vaginal. Segundo o guia da Anvisa e a *guideline* CPMP/SWP/2145/00, para essas vias as seguintes considerações devem ser observadas (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

11.6.1. Via dérmica

Os medicamentos para administração cutânea necessitam realizar os testes de tolerância local com dose única, dose reiterada e avaliação do potencial de sensibilidade. Para esses testes, geralmente, a espécie escolhida para o estudo *in vivo* é o coelho, respeitando sempre a escolha da espécie mais relevante (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Segundo a *guideline* CPMP/SWP/2145/00, em alguns casos é indicado a avaliação de fototoxicidade e potencial de fotossensibilização, para além dos testes descritos acima. Além disso, a aplicação intencional do produto em outros locais do corpo (por exemplo, olhos), também deve ser considerada. Há a necessidade de realizar testes semelhantes aos descritos acima para os medicamentos aplicados sobre a pele a fim de obter efeitos sistêmicos para novos veículos destinados ao uso na pele. Se houver variação na dose administrada (por exemplo, a determinação da toxicidade sistêmica, por administração dérmica), isto deve ser conseguido por alteração da quantidade de produto aplicado e/ou alterando a área de administração, uma vez que as modificações na concentração ou no veículo levem a alterações não-proporcionais na absorção e na tolerância local. Tais dados não são descritos no guia da Anvisa (European Medicines Agency 2001).

Os testes de dose única envolvem os testes de corrosão da pele, *in vitro*, e os testes de irritação, *in vivo* - coelhos. Os parâmetros a serem observados são o grau de eritema, edema, descamação, formação de cicatriz e outras lesões. A duração do estudo dependerá das mudanças observadas em 24, 48 e 72 horas após a administração do fármaco. Nos casos em que as mudanças persistam por mais tempo poderão ser necessárias observações por período maior que oito dias (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Nos testes de dose reiterada a pele deverá ser avaliada de acordo com os mesmos parâmetros e duração determinada para dose única, e exames histopatológicos devem ser considerados caso a caso (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

O teste de potencial de sensibilidade deverá ser realizado em modelos de ensaios de *guinea pig* e nódulo linfático (LLNA - *Local Lymph Node Assay*) (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

11.6.2. Via Parenteral

Os testes de tolerância por via parenteral incluem as vias: intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intratecal, subcutânea e vias paravenosas. Os seguintes locais podem ser usados como via de acesso, respectivamente (European Medicines Agency 2001):

- Veias adequadas da orelha, da cauda e da parte posterior dos membros dianteiros;
- Artéria central da orelha de coelhos, artéria femoral ou em artérias adequadas de outras espécies;
- Músculo dorsal ou femoral;
- Tecido subcutâneo na lateral da caixa torácica ou outros locais adequados;
- Tecido paravenoso próximo às veias citadas acima.

Tais dados não foram observados no guia da Anvisa (2013).

Os seguintes parâmetros devem ser avaliados (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Frequência de administração: única. Em alguns casos, administrações repetidas (sete dias) podem ser importantes.
- Para única administração, observações repetidas dos animais e dos locais de administração devem ser realizadas durante 48 a 96 horas depois da administração. Em seguida, um cuidadoso exame macroscópico dos locais de administração e tecidos circundantes deve ser realizado. Caso seja necessário para diagnóstico, um exame histológico poderá ser também realizado.
- Para administrações reiteradas, há a necessidade de observar os animais e os locais de administração. Após a última administração, os procedimentos devem ser os mesmos recomendados para administração única.

11.6.3. Via ocular

O tipo de ensaio de tolerância ocular será determinado pela magnitude da exposição ao produto (por exemplo, produtos que se destinem a ser administrado repetidamente ao olho, obviamente requerem mais extenso estudo do que para os produtos sujeitos a exposição acidental) (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Os testes podem ser realizados em dose única ou em regime de dose reiterada. O teste de tolerância ocular de dose única é normalmente realizado em coelhos. Neste teste, um olho serve como alvo de tratamento, o outro como controle. As áreas em torno dos olhos, incluindo as pálpebras, conjuntiva, córnea e íris, também deverão ser examinadas durante o ensaio. Os olhos devem ser examinados, no mínimo, 72 horas após a administração. O investigador deve concluir o teste com uma avaliação adequada das reações observadas. O tipo e a extensão da investigação realizada será determinada caso a caso (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

O teste de tolerância ocular de dose reiterada normalmente é realizado em coelhos com administração diária durante quatro semanas. O desenho deste teste deve considerar os resultados da tolerância ocular dose única e o exame histológico deverá ser considerado caso a caso (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Em ambos os experimentos há a necessidade de avaliar os diferentes tecidos em contato com o produto, incluindo o corpo vítreo e o fundo ocular. A avaliação da tolerância ocular também é necessária para os produtos que não se destinam a utilização nos olhos, mas para os quais se possa razoavelmente esperar que resulte exposição no decurso da sua utilização clínica normal (por exemplo, loções ou gel utilizados para o tratamento da pele da face, champô medicinal, etc.) Nestes casos, um teste de tolerância ocular usando uma única administração deverá ser realizada (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

11.6.4. Via Retal

A seleção das espécies deve ser justificada, mas geralmente são utilizados coelhos ou cães. O volume de aplicação é baseado na dose terapêutica humana da formulação galénica ou no volume máximo aplicável à espécie animal. A administração do composto normalmente ocorre uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias, de acordo com a utilização clínica (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

No final do estudo vários parâmetros devem ser avaliados. É importante observar a região anal e esfíncter anal, os sinais clínicos e fezes. Será necessário sacrificar os animais após a administração, para realizar os exames de necropsia e exame macroscópico da mucosa retal. Exame histológico para diagnóstico deve ser realizado quando necessário. Como nos medicamentos administrados sobre a pele, o potencial de sensibilidade deve ser avaliado por meio de testes validados (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

11.6.5. Via Vaginal

Conforme observado nos outros estudos a seleção das espécies deve ser justificada, para além dos animais descritos anteriormente (coelho e cão) os estudos também podem ser realizados em ratos. O volume de aplicação é baseado na dose terapêutica humana ou no volume máximo aplicável à espécie animal. A administração normalmente é realizada uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias, de acordo com a utilização clínica (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

No final do estudo vários parâmetros devem ser avaliados, tais como: observação da região vaginal, sinais clínicos e secreção vaginal. Se os animais forem sacrificados após administração, deve ser realizado necropsia e exame macroscópico da mucosa vaginal e do sistema reprodutor. Também deve ser realizado um exame histológico para diagnóstico. Investigações adicionais deverão ser consideradas caso a caso. Tal como nos medicamentos administrados sobre a pele, potencial de sensibilidade deve ser avaliado por meio de testes validados, geralmente realizados em *guinea pig* (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

11.7. Potencial de Sensibilidade

Para compostos aplicados na pele/mucosa (aplicação dérmica, retal e vaginal) é necessário a realização de estudos de sensibilidade. Dois testes são adequados para esse estudo, isto é, avaliação em *guinea pig* e avaliação local de linfonodos. O protocolo do ensaio em *guinea pig* deve seguir o guia EEC/OECD para testes químicos nº406 (European Medicines Agency 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Segundo a Anvisa a avaliação local de linfonodos deve seguir a *guideline* NIH Publication Nº: 99-4494 - *The Murine Local Lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds* (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Adicionalmente, a *guideline* CPMP/SWP/2145/00 descreve que os estudos em linfonodo devem ser conduzidos em fêmeas de ratinho (8 a 12 semanas de vida) da linhagem CBA/Ca e CBA/J (European Medicines Agency 2001).

12. Imunotoxicidade

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S8 - Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals

Anvisa – NÃO APLICAVEL

A primeira *guideline* ICH produzida sobre os estudos de imunotoxicidade foi publicada no ano de 2005, e é intitulada ICH S8 - *Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals*, estando em vigor até os dias atuais. O Brasil, através do guia da Anvisa (2013), ainda não publicou *guideline* referente aos estudos de imunotoxicidade.

Nessa *guideline* a imutotoxicidade é definida como o desenvolvimento não intencional de imunossupressão ou aumento desse efeito, imunoestimulação. É importante informar que os efeitos tóxicos de hipersensibilidade e autoimunidade desenvolvidos em função do medicamento não são parâmetros incluídos nesse estudo. Sendo assim, os objetivos desta *guideline* são fornecer recomendações sobre o desenho do estudo não-clínicos para identificar compostos com potencial imunotóxico e facultar orientação sobre a avaliação dos resultados encontrados nesse teste (International Conference on Harmonisation 2005c).

A avaliação inicial da imunotoxicidade deve estar integrado nos estudos toxicológicos não-clínicos de administração reiterada, porém estudos adicionais podem ser realizado conforme a necessidade de cada estudo (Figura 9). Os efeitos tóxicos podem ser de supressão ou de aumento da resposta imune. A supressão da resposta imune pode levar a uma diminuição da resistência do paciente a agentes infecciosos ou estímulos mutagênicos e enquanto o aumento da resposta imune pode desencadear ou piorar doenças autoimunes e hipersensibilidade. Os efeitos tóxicos

podem estar associados a dois grupos de medicamentos (International Conference on Harmonisation 2005c):

- Fármacos que modulam a função imunitária para fins terapêuticos, onde a resposta imunossupressora pode ser associada a uma resposta farmacodinâmica exagerada, ou;
- Fármacos destinado a outras patologias, mas que causam imunotoxicidade como efeito secundário.

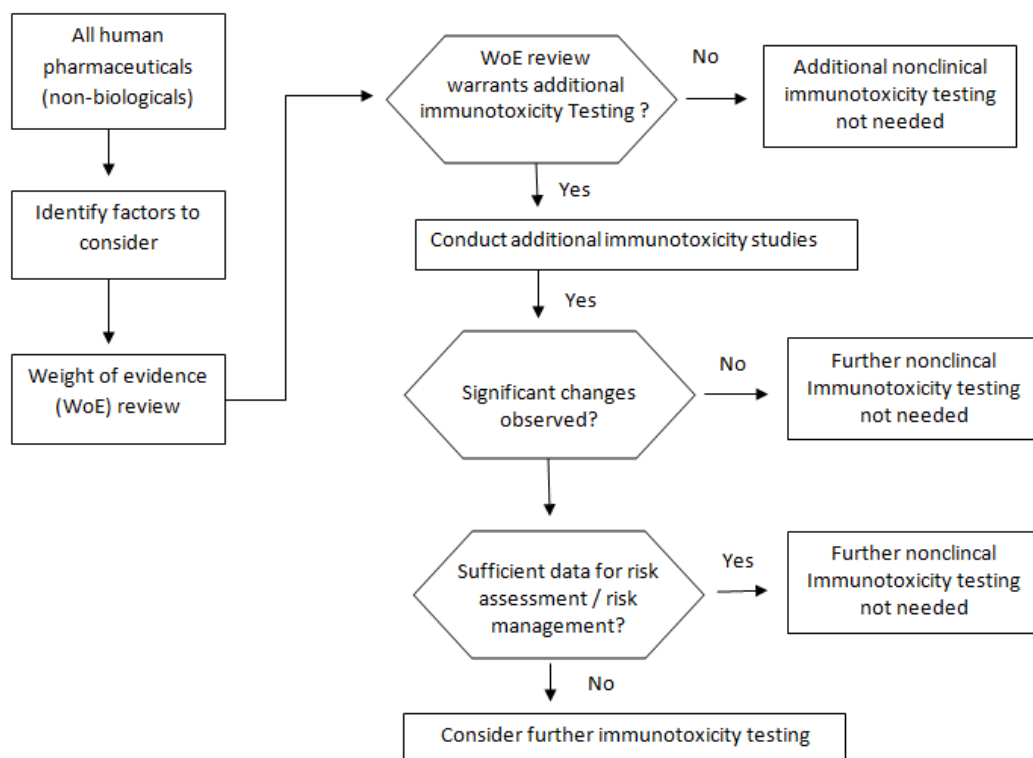


Figura 10: Diagrama de recomendação para avaliação Imunotóxica (International Conference on Harmonisation 2005c)

Os testes de imunotoxicidade geralmente estão integrados nos estudos de dose reiterada realizadas em roedores e não roedores. Os parâmetros avaliados nesse estudo para determinação do potencial risco de imunotoxicidade são parâmetros hematológicos, alterações no sistema imune (*Clinical Chemistry*), aumento de incidência de infecções e tumores, peso dos órgãos envolvidos e histologia. Similarmente aos estudos toxicológicos em outros sistemas, a avaliação de imunotoxicidade deve incluir os seguintes parâmetros (International Conference on Harmonisation 2005c):

- Mudanças estatísticas e biológicas significantes;
- Gravidade dos efeitos;
- Relação dose/resposta;
- Fator de segurança em relação a dose clínica;
- Duração do tratamento;
- Número de espécies e parâmetros afetados;
- Alterações que podem ocorrer secundariamente a outros fatores;
- Possíveis alvos celulares e/ou mecanismo de ação;
- Doses que produzem essas mudanças em relação às doses que produzem outros efeitos tóxicos;
- Reversibilidade dos efeitos.

Caso seja evidenciado, a partir dos resultados dos estudos de administração reiterada, que estudos de imunotoxicidade adicionais são necessários, estes devem ser concluídas antes de iniciar a Fase III dos estudos clínicos. Isto irá permitir a incorporação de parâmetros para o controlo do sistema imunitário, se apropriado (International Conference on Harmonisation 2005c; International Conference on Harmonisation 2009a).

12.1. Propriedades farmacológicas

Para os compostos que possuam propriedades farmacológicas que indiquem um potencial imunotóxico, testes adicionais de imunotoxicidade deverão ser considerados. Informações obtidas a partir dos estudos de farmacologia pode ser usados para decidir quais estudos adicionais são necessários (International Conference on Harmonisation 2005c).

Compostos com estrutura química similar a compostos que apresentem imunotoxicidade, metabólitos *major* e efeitos tóxicos evidenciados em estudos clínicos devem ser avaliados quanto a necessidade de inclusão de testes adicionais (International Conference on Harmonisation 2005c).

12.2. População alvo

Estudos adicionais serão necessários caso a maioria da população alvo esteja imunocomprometida por uma doença ou tratamento concomitante. O estudo poderá ocorrer no início da avaliação toxicológica do fármaco (International Conference on Harmonisation 2005c).

12.3. Desenho de estudos de imunotoxicidade adicionais (específicos)

Estudos adicionais destinados à avaliação específica do potencial de imunotoxicidade de um fármaco são geralmente realizados em roedores, com uma duração de 28 dias em regime de administração de dose reiterada. A espécie, estirpe, a dose, duração e via de administração utilizada nesses estudos devem ser compatíveis, na medida do possível, com o estudo de toxicidade padrão em que foi observado o efeito imunotóxico. Normalmente são utilizados animais de ambos os sexos, excluindo os primatas não-humanos. A dose mais elevada deve estar acima da NOAEL, mas abaixo de uma concentração que induza alterações secundárias devido ao *stress* (International Conference on Harmonisation 2005c).

Os estudos recomendados como testes adicionais de imunotoxicidade são os que envolvem a avaliação qualitativa e quantitativa dos leucócitos tais como resposta de anticorpos dependente de células T (TDAR), imunofenotipagem, atividade de celular NK (*Natural Killer*), estudos de resistência hospedeira, função macrófago/neutrófilo e mensuração de células mediadoras de imunidade (International Conference on Harmonisation 2005c).

O estudo TDAR utiliza o antígeno específicos das células T, pois irá resultar em uma resposta imune exacerbada. Os anticorpos podem ser medidos usando o teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) ou outros métodos de imunoensaio. Para estes estudos, os dados podem ser expressos como a soma da resposta imune ao longo de várias datas de colheita (por exemplo, área sob a

curva). É necessário levar em consideração a espécie utilizada, pois existe variação entre espécies (International Conference on Harmonisation 2005c).

O teste de imunofenotipagem é definido como a identificação e/ou contagem de subconjuntos de leucócitos formadores de anticorpos. Imunofenotipagem é geralmente conduzida por análise de citometria de fluxo ou por imuno-histoquímica. O estudo de células NK (*Natural Killers*) pode ser feito nos ensaios de imunofenotipagem e, em geral, todos os ensaios de células NK são realizados em ensaios *ex vivo* em amostras, tecido (baço) ou sangue, obtidas a partir dos animais que foram tratados com o composto teste (International Conference on Harmonisation 2005c).

Estudos de resistência ao hospedeiro envolvem animais, ratinhos ou ratos, tratados com diferentes doses do composto teste em concentrações variáveis de algum agente patogénico (bactérias, fungos, vírus, parasitas ou células tumorais). Esse teste fornece informações sobre a suscetibilidade do paciente a determinadas classes de agentes infecciosos ou células tumorais. Além disso, eles podem ter um papel importante na identificação ou confirmação do tipo de célula afetada pelo fármaco (International Conference on Harmonisation 2005c).

13. Dependência e Tolerância

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

EMA/CHMP/SWP/94227/2004 - Guideline on the Non-Clinical Investigation of the Dependence Potential of Medicinal Products

Anvisa – Tema não abordado

A EMA publicou a primeira guideline estudos toxicológicos não-clínicos sobre dependência e tolerância no ano de 2006, intitulada EMA/CHMP/SWP/94227/2004 - *Guideline on the Non-Clinical Investigation of the Dependence Potential of Medicinal Products*. Estando até o momento em vigência (European Medicines Agency 2006).

Para os medicamentos que produzem atividade do sistema nervoso central, ou que se distribuem no sistema nervoso central independentemente do seu mecanismo de ação, independentemente da indicação terapêutica, deve-se considerar se é ou não justificada uma avaliação no risco de abuso do uso do medicamento (dependência/tolerância). Estudos não clínicos devem apoiar o projeto de avaliações clínicas do potencial de abuso, classificação/agendamento por agências reguladoras, e informações sobre o produto (International Conference on Harmonisation 2009a).

O Potencial de dependência é a propensão que uma substância ativa possui, como uma consequência de seus efeitos farmacológicos sobre as funções fisiológicas ou psicológicas, para dar origem a necessidade no aumento na frequência do uso da substância ativa (doses) acima da recomendado, com o objetivo de "sentir-se bem" ou para evitar o "sentir-se mal" (European Medicines Agency 2006).

O potencial de dependência é determinado por propriedades farmacológicas intrínsecas que podem ser mensuradas em estudo em animais e humanos (não-clínicos e clínicos) com o medicamento teste. A *guideline* EMEA/CHMP/SWP/94227/2004 introduz uma abordagem em dois níveis de investigação do potencial de dependência de novas substâncias ativas no sistema nervoso central. No primeiro nível os estudos revelam o perfil farmacológico da substância ativa, baseado nesses dados e de outros indicadores se analisa a necessidade de realizar estudos subsequentes de dependência e tolerância..

Os dados não clínicos recolhidos no início do processo de desenvolvimento de medicamentos podem ser úteis na identificação de indicadores precoces de potencial abuso. Os indicadores precoces normalmente estariam disponíveis antes da primeira dose em humanos e incluem o perfil PK/PD para identificar a duração de ação, similaridade da estrutura química com outros fármacos conhecidos por uso abusivo, o perfil de ligação ao recetor, e os sinais comportamentais/clínicos a partir de estudos não clínicos *in vivo* (International Conference on Harmonisation 2009a).

O primeiro nível dos estudos envolve a avaliação *in vitro* e *in vivo* e o segundo nível da avaliação envolve estudos específicos de farmacologia comportamental. Propriedades de reforço e abstinência física são aspetos bem conhecidos do potencial de abstinência, entretanto outros aspetos que são mais difíceis de serem observados na observação clínica, como ié o caso dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina, também precisam ser avaliados. A relevância dos dados para avaliação da segurança humana em relação ao potencial de dependência a um medicamento deve ser observada conforme o Figura 11 abaixo. E quando realizados devem estar prontos antes do início dos estudos clínicos de Fase I (European Medicines Agency 2006).

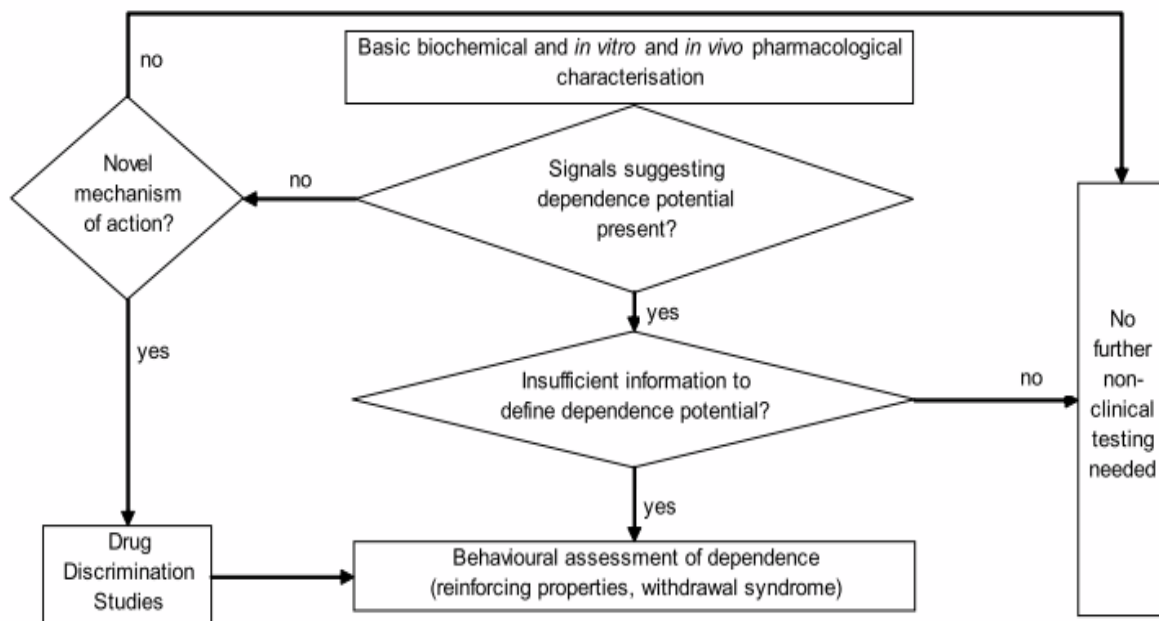


Figura 11: Tomada de decisão para estudo não-clínico de potencial de dependência (European Medicines Agency 2006)

Geralmente, se a substância ativa demonstra sinais associados com os padrões de abuso conhecidos ou possui um novo mecanismo de ação sobre o sistema nervoso central, outros estudos não clínicos são recomendados para dar suporte aos ensaios clínicos (Fase III) (International Conference on Harmonisation 2009a).

14. Estudos de Fototoxicidade

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S10 - Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals (**Step 2**)

CPMP/SWP/398/01 - Note for guidance on photosafety testing

Anvisa – Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

A EMA publicou a primeira guideline sobre fototoxicidade no ano de 2002 intitulada CPMP/SWP/398/01 - *Note for guidance on photosafety testing*. Em Janeiro de 2008, foi acordado através da CHMP que a guideline CPMP/SWP/398/01 deveria ser revisada com a previsão de publicação no ano de 2013. Desta forma a ICH está desenvolvendo uma nova guideline intitulada ICH S10 - *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals*, que está desde 2012 em consulta pública (step 2) (European Medicines Agency 2002b; International Conference on Harmonisation 2012c)

A *guideline* de ensaios de fototoxicidade tem como principais objetivos definir os critérios mais importantes para a realização de estudos de fototoxicidade de segurança e estabelecer o melhor modo de avalia-los nos estudos não-clínicos (European Medicines Agency 2002b).

O objetivo dos testes de fototoxicidade é detetar efeitos tóxicos causados por produtos farmacêuticos na presença de luz. Os testes deverão avaliar quaisquer efeitos mecânicos ou físico-químicos da administração do produto que podem ser distintas dos efeitos toxicológicos ou farmacodinâmicos do fármaco (European Medicines Agency 2002b).

As recomendações fornecidas pela guideline ICH M3-R2 (2009) sugerem que em casos em que seja identificado algum potencial risco humano para a

fototoxicidade uma avaliação experimental do potencial fototóxico deve ser realizada. Tal procedimento deverá ser feito antes que haja uma exposição a um de grande número de pacientes (Fase III) (European Medicines Agency 2011a).

Neste capítulo serão descritos os requisitos necessários aos estudos de fototoxicidade conforme a *guideline* CPMP/SWP/398/01 concomitantemente com as possíveis mudanças propostas pela nova *guideline* ICH S10 (step 2).

Ao longo dos anos, acumularam-se dados e experiências na área da fototoxicidade, e foram evidenciadas deficiências importantes nas recomendações existentes na *guideline* CPMP/SWP/398/01. Os principais critérios que estão em discussão na *guideline* ICH S10 (step 2) são (European Medicines Agency 2011a):

- Definir os critérios de absorção de luz e exposição da pele para início dos testes de fototoxicidade;
- Definir os critérios de absorção/acumulação a nível tecidual (pele e olhos);
- Definir os critérios para a realização de testes de segurança;
- Realização de estudos de segurança com o composto e seus metabólitos;
- Os dados dos testes *in vitro* e *in vivo* para os estudos de clastogenicidade devem estar devidamente descritos e correlacionados com os dados clínicos;
- Os dados de fototoxicidade devem estar devidamente claros;
- Um consenso sobre a necessidade dos testes de fototoxicidade deve estar estabelecido.

Segundo a ICH S10 (step 2), procura-se nos estudos não-clínicos para fototoxicidade o emprego de testes altamente sensíveis e específicos (baixa incidência de falsos negativo e falsos positivo). Entretanto, o mais importante é que os testes apresentem alta sensibilidade, isto é, que apresenta baixa frequência de resultados falsos negativos. Este requisito é justificado pelo fato de que, quando há resultados negativos, geralmente não serão necessários testes adicionais. Os testes *in vitro* e *in vivo* estão destinados primariamente a determinar a existência de potencial risco, mesmo que futuramente este se revele irrelevante (International Conference on Harmonisation 2012c).

Reações fotobiológicas normalmente ocorrem quando o composto é capaz de absorver radiação UV ou luz visível. A *guideline* CPMP/SWP/398/01 descreve que

os testes fototóxicos de segurança são relevantes para produtos que são absorvidos através da pele ou sistema circulatório. Segundo esta *guideline* quatro diferentes parâmetros devem ser investigados durante esse estudo (European Medicines Agency 2002b):

- Fototoxicidade;
- Fotoalergia;
- Fotogenotoxicidade;
- Fotocarcinogenicidade.

Entretanto, observa-se que segundo a *guideline* ICH S10 (step 2) os testes de fotogenotoxicidade e fotocarcinogenicidade não são mais considerados úteis na avaliação de fotosegurança para medicamentos de uso humano. Este novo documento aborda somente os efeitos de fototoxicidade e fotoalergia conforme definido abaixo (International Conference on Harmonisation 2012c):

- Fototoxicidade (fotoirritação): Uma resposta tecidual aguda induzida por uma substância química fotorreativa quando exposta a luz.
- Fotoalergia: uma reação imunológica, a um produto químico, iniciada pela formação de fotoprodutos (por exemplo, aductos de proteína) seguida de reação fotoquímica.

Os testes empregados nos estudos de toxicidade são: aplicação local/tópica e reação em pele ou olhos seguidos de exposição sistêmica. Normalmente o espectro de irradiação aproxima-se do espectro da luz visível sendo utilizados os testes simuladores solares (simuladores de radiação). A dose de radiação não deve limitar-se somente a efeitos deletérios leves devendo ser suficientemente elevada para garantir uma ativação eficiente e uma boa visualização do potencial fototóxico como pode ser visto nos atributos requeridos e listados abaixo (European Medicines Agency 2002b):

- Absorve a luz na gama de luz natural (290-700 nm);
- Gerar um composto reativo após a absorção de luz UV/visível;

- Distribuir-se suficientemente para os tecidos expostos à luz (por exemplo, pele, olhos).

A seleção da radiação é uma condição crítica para os testes *in vitro* e *in vivo*, sendo assim a escolha da radiação deve ser efetuada levando em consideração as radiações já determinadas em *guidelines*. Doses entre 5 e 20 J/cm² de radiação UVA (320 a 400nm) são consideradas satisfatórias para os ensaios de fototoxicidade. A exposição humana a luz é normalmente limitada pelas reações de queimadura solar provocadas pela radiação UVB, pelo que a quantidade de UVB pode ser atenuada (parcialmente filtrada) de modo a que as doses UVA relevantes possam ser testadas, sem reduzir a sensibilidade do ensaio. A penetração da luz UVB na pele humana é limitada principalmente à epiderme, enquanto que a radiação UVA pode atingir os vasos capilares. Dessa forma, a ativação UVB é considerado de menor importância do que a UVA para os medicamentos de uso sistêmicos. No entanto, a radiação UVB é relevante para formulações tópicas (International Conference on Harmonisation 2012c).

A excitação de moléculas através da luz pode gerar espécies de oxigênios reativos (ROS - *Reactive Oxygen Species*) através do mecanismo de transferência de energia, os quais incluem os superóxidos e oxigênios singletos. O aparecimento de ROS nos testes realizados após irradiação com luz ultravioleta ou visível pode ser um indicador do potencial fototóxico. Embora sejam conhecidos outros mecanismos de fototoxicidade (formação de fotoadutores ou fotoprodutos citotóxicos), mesmo nestes casos verifica-se também a geração de ROS (International Conference on Harmonisation 2012c).

Para um composto demonstrar fototoxicidade e/ou fotoalergia as seguintes condições críticas devem ser observadas abaixo e na figura 8. Quando uma ou mais dessas condições não forem observadas o composto não apresenta preocupação quanto a fototoxicidade (International Conference on Harmonisation 2012c).

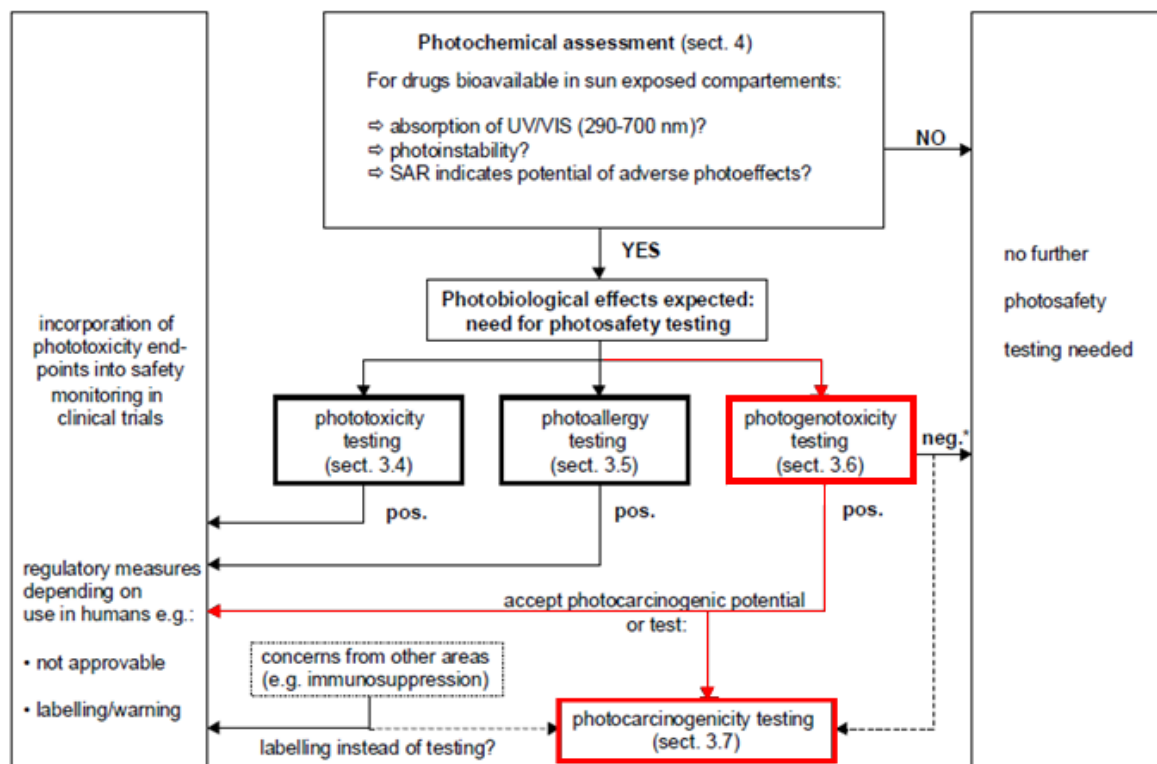


Figura 12: Avaliação de fototoxicidade de novos produtos (European Medicines Agency 2002b)

Conforme a guideline CPMP/SWP/398/01 o teste de fotogenotoxicidade é considerado um teste importante para avaliar um possível potencial genotóxico induzido pela radiação. Porém, a guideline ICH S10 (step 2) sugere que a interpretação dos dados neste teste não é clara na maioria dos casos. A avaliação do potencial risco fotocarcinogénico está baseada, usualmente, nos dados de achados relevantes de fototoxicidade, informação sobre potencial carcinogénico de compostos quimicamente relacionados, grau de exposição humana e duração do tratamento, mas independe dos resultados de fotogenotoxicidade. Por essa razão, foi recomendado a extinção dos testes de fotogenotoxicidade no estudo padrão de fotosegurança. Sendo assim, os testes de fototoxicidade segundo a guideline ICH S10 (step 2) deverão avaliar os efeitos em geral, mecânicos e físico-químicos, do produto que podem ser distinguidos entre efeitos toxicológicos ou farmacodinâmicos (European Medicines Agency 2011a)

Além disso, a *guideline* CPMP/SWP/398/01 (2002b) recomenda principalmente para os estudos de genotoxicidade *in vivo* o teste de

fotoclastogenicidade (aberração cromossômica e teste de micronúcleos) em células de mamíferos, porém, a *guideline* ICH S10 (step 2) descreve que os dados recolhidos, ao longo dos anos acerca desse assunto, demonstraram que esse teste é demasiado sensível resultando em falsos positivos. Sendo assim, a avaliação *in vivo* de clastogênese deixam de ser recomendados (European Medicines Agency 2011a).

14.1. Modelo animal

A *guideline* CPMP/SWP/398/01 sugere que o modelo recomendado para o estudo *in vitro* de fototoxicidade é o 3T3 NRU-PT (3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test). Esse teste é baseado na comparação da citotoxicidade do composto teste quando exposto a doses não citotóxicas de radiação UV ou luz visível. Recomenda-se a utilização de células fibroblásticas de ratinho, linhagem Balb/c 3T3, nos protocolos padrão da Europa e OECD. Na maioria dos casos esse teste produz informação suficiente acerca do potencial fototóxico não sendo necessário a realização de estudos *in vivo*. Mas caso os resultados sugiram algum potencial fototóxico outros testes devem ser realizados para avaliar o potencial risco associado. A *guideline* ICH S10 (step 2) também recomenda esse estudo (European Medicines Agency 2002b; International Conference on Harmonisation 2012c).

O estudo 3T3 NRU-PT é um teste muito sensível e muitos resultados positivos não são confirmados nos estudos *in vivo*. Entretanto, essa alta sensibilidade é importante para prever resultados negativos (evita falsos negativos). Resultados negativos, nesse teste, são por isso geralmente aceites e considerados suficientes para estabelecer que o composto não é fototóxico. Entretanto resultados positivos, nesse estudo, não devem ser considerados como indicativos de um possível risco fototóxico, mas indicar a necessidade de mais avaliações. Uma avaliação inicial de fototoxicidade feita diretamente em seres humanos pode ser uma alternativa aceitável para a realização do teste 3T3 NRU-PT, desde que o desenho do estudo mostre ser adequado e suficientemente sensível para detetar reações fototóxicas em humanos (International Conference on Harmonisation 2012c)

Outro teste *in vitro* é o que utiliza a linhagem celular BALB/c 3T3 sensível a radiação UVB. Sua utilização deve ser feita usando filtros que atenuarão a incidência de comprimentos de onda abaixo de 320nm. Esse teste é utilizado principalmente para fármacos aplicados pela via tópica e que absorvem predominantemente radiação UVB, faixa de radiação onde a avaliação *in vitro* é desejada (International Conference on Harmonisation 2012c).

Nos casos em que os estudos 3T3 NRU-PT ou BALB/c 3T3 não são suficientes ou mais indicados, a avaliação deverá contar com outros testes. Como opção experimental pode ser utilizado o modelo 3D de reconstrução da pele. É importante compreender a sensibilidade do modelo de pele 3D escolhido e, se necessário, ajustar as condições necessárias ao ensaio. No entanto, sob condições adequadas, um resultado negativo num modelo de pele 3D indica que o potencial de fototoxicidade da formulação pode ser considerado baixo. Neste caso, a Europa e o Japão geralmente não exigem mais testes de fototoxicidade. Nos EUA, resultados negativos em geral, não impedem uma nova avaliação (International Conference on Harmonisation 2012c).

A utilização de sistemas metabolizadores, tais como a mistura S9 de fígado de rato, é uma exigência geral para os ensaios *in vitro* que têm uma capacidade metabólica limitada. Esse sistema possibilita a geração de metabólitos fotorreativos que deverão ser considerados na avaliação toxicológica geral. A não utilização dessa mistura nos testes de fototoxicidade *in vitro* pode ser justificada por razões técnicas, uma vez que tem sido demonstrado que a adição de um material com alto teor de proteína pode alterar a análise dos resultados porque pode absorver ou dispersar a luz na região ultravioleta e, assim, proteger as células-alvo de possíveis efeitos fototóxicos (European Medicines Agency 2002b).

Segundo a *guideline* S10 (step 2) geralmente não se justifica a avaliação de fotosegurança separadamente para metabólitos uma vez que o metabolismo tipicamente não cria novos cromóforos (International Conference on Harmonisation 2012c).

Segundo a *guideline* CPMP/SWP/398/01 os testes de fotoalergia utilizam normalmente o modelo de estudo *in vivo* com a espécie animal *guinea pig*. Esse estudo monitoriza as reações fotoquímicas (fotooxidação e formação de fotoadutor)

no tecido alvo. Os testes de fotoalergia podem ser realizados em compostos que são administrados diretamente na pele, porém tal teste não é recomendado para as outras vias de administração (European Medicines Agency 2002b).

Segundo a *guideline* ICH S10 (step 2) até ao momento nenhum estudo não clínico de fototoxicidade ou fotoalergia foi formalmente validado. Testes de fototoxicidade para administrações sistêmicas foram conduzidos em uma variedade de espécies de animais, tais como *guinea pig*, rato e ratinho. No entanto nenhum estudo está padronizado ficando a cargo da indústria a decisão da escolha da espécie relevante. Para a seleção das espécies devem ser consideradas os seguintes critérios: a sensibilidade à irradiação, tolerância ao calor, e o desempenho de substâncias de referência. Os modelos com animais, tanto pigmentados e não pigmentados estão disponíveis e embora existam diferenças quanto a sensibilidade à fototoxicidade entre os modelos, é necessário avaliar a influência da ligação do fármaco a melanina aquando da escolha da espécie para garantir a exposição adequada nos tecidos-alvo (International Conference on Harmonisation 2012c).

A ligação do medicamento teste à melanina é um mecanismo de ação que pode causar a retenção e/ou acumulação do fármaco no tecido. Embora essa ligação possa aumentar os níveis da concentração tecidual, a experiência com fármacos ligados a melanina sugere que tal ligação por si só não apresenta uma preocupação de fotosegurança (International Conference on Harmonisation 2012c).

Segundo a *guideline* CPMP/SWP/398/01 existem outros modelos de estudo *in vivo* em fase de desenvolvimento, podendo citar-se os estudos com células LLNA modificadas (*Local Lymph Node Assay*) e células MEST (*Mouse Ear Swelling Test*). Esses modelos podem ser utilizados em um futuro próximo uma vez que a validação ainda é limitada. Porém esses estudos não são referenciados na *guideline* ICH S10 (draft) (European Medicines Agency 2002b; International Conference on Harmonisation 2012c).

Os testes de fotogenotoxicidade são realizados principalmente em modelos *in vitro*, e posteriormente empregues em modelos *in vivo*. É necessário observar que os testes padrão *in vivo* geralmente utilizados nos estudos de genotoxicidade (testes em micronúcleos de medula óssea ou teste de aberração cromossômica, ambos em rato) não se aplicam para a deteção de fotogenotoxicidade. Para os testes de

fotocarcinogenicidade o único modelo *in vivo* aceite pela ICH, em concordância com as regras de GLP, é o modelo em ratinho albino SKH1 (hr/hr), entretanto esse modelo não está devidamente validado. Como alternativa, estudos mecanicistas *in vitro* de fotogenicidade podem ser usados para avaliar o potencial fotocarcinogênico do composto (European Medicines Agency 2002b).

Tais testes já não são recomendados na *guideline* ICH S10 (step 2) (2012).

14.2. Dosagem

Um estudo de distribuição tecidual com dose única, com animais avaliados em vários momentos após a administração, geralmente fornece uma avaliação adequada dos níveis do fármaco no tecido e do potencial de acumulação. Embora a utilização de uma dose abaixo do limiar de concentração tecidual resulte na percepção reduzida do risco de reações de fototoxicidade, não existem atualmente dados para delinear um limite genérico para todos os compostos (International Conference on Harmonisation 2012c).

Embora a fototoxicidade seja tipicamente uma reação aguda a duração de um ensaio *in vivo* deve ser cuidadosamente considerada. A acumulação do composto nos tecidos relevantes expostos a luz pode levar a um aumento da sensibilidade após administração reiterada. Do mesmo modo a irradiação repetida após cada dose também pode levar a um aumento da sensibilidade, devido à acumulação de danos. Geralmente, os estudos de alguns dias com dose reiterada são adequados, mas as propriedades farmacocinéticas, bem como o regime de tratamento clínico pretendido devem ser levados em consideração (International Conference on Harmonisation 2012c).

A dosagem utilizada no estudo de fototoxicidade deve ser decidida com base na seção 1.5 da *guideline* ICH M3-R2. Doses limite de 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores são consideradas adequadas. Nos casos em que a dose de 1000 mg/kg/dia não resultar em uma margem de exposição média de 10 vezes a exposição clínica e/ou a dose clínica exceda 1 g por dia, as doses devem ser limitadas a 10 vezes a margem de exposição clínica ou uma dose de 2000 mg/kg/dia

ou o MFD (*Maximum Feasible Dose*), a que for menor (International Conference on Harmonisation 2009a).

Se for obtido um resultado negativo com a dose alta, ensaios de doses mais baixas geralmente não se justificam. No entanto, se um resultado positivo for antecipado, grupos de doses adicionais podem apoiar uma avaliação de risco baseada em NOAEL. Um grupo controlo irradiado, bem como os controlos não irradiados podem apoiar as análises, podendo especificar entre as reações tóxicas induzidas por irradiação e não-induzidas por irradiação. Se a exposição sistémica máxima alcançada nos animais é menor do que a exposição clínica, a confiabilidade de um resultado negativo na previsão de risco humano é questionável (International Conference on Harmonisation 2012c).

14.3. Via de administração

Sempre que possível deve ser usada a via pretendida para uso clínico em humanos (International Conference on Harmonisation 2012c).

Para dar suporte a uma via de administração diferente da via de administração pretendida para uso humano, um estudo de tolerância local com dose única e em uma única espécie é considerado apropriado. Em casos onde a exposição sistémica (AUC e C_{max}) a administrações não terapêuticas são cobertas pelos estudos toxicológicos existentes, a observação final (*endpoint*) do estudo será limitada a observação de sinais clínicos e exames macro e microscópicos do local de aplicação. A formulação utilizada nos testes não precisa ser idêntica à usada em humanos, mas deve existir similaridade (International Conference on Harmonisation 2009a).

Segundo a *guideline* ICH S10 (step 2) a irradiação da área exposta deve ser feita num momento especificado após a aplicação do composto teste, e o intervalo entre a aplicação e a irradiação deve ser justificada em função das propriedades específicas da formulação a ser testada. A avaliação dos níveis sistêmicos do fármaco geralmente não é necessária. A fototoxicidade e fotoalergia são frequentemente investigadas em conjunto com o teste de sensibilidade da pele. Para

fins regulatórios, o teste de fotoalergia geralmente não é necessário (International Conference on Harmonisation 2012c).

Testes de fotoalergia não são recomendados para compostos que são administrados por via sistêmica (International Conference on Harmonisation 2012c).

14.4. Teste de fototoxicidade *in vivo* – Administração Tópica

Em geral para medicamentos de aplicação dérmica deve-se testar a formulação que será pretendida para o uso humano, bem como utilizar, na medida do possível, as condições clínicas de administração pretendida para o uso humano. A irradiação da área exposta deve ser feita em um momento específico após a aplicação do composto teste, e o intervalo entre a aplicação e a irradiação deve ser devidamente justificado em função das propriedades específicas da formulação a ser testada. Sinais de fototoxicidade devem ser avaliados com base em parâmetros relevantes. A sensibilidade do ensaio deverá ser demonstrada apropriadamente em comparação ao composto de referência. A avaliação dos níveis sistêmicos geralmente não se justifica em estudos de fototoxicidade cutânea (International Conference on Harmonisation 2012c).

Para medicamentos de aplicação dérmica os testes de fototoxicidade aguda (fotoirritação) e fotossensibilidade são frequentemente realizados em conjunto com os ensaios não-clínicos de sensibilização da pele. No entanto, nenhuma validação formal de tais modelos foi realizada e sua previsibilidade de fotoalergia humana é desconhecido. Para fins regulamentares, esse ensaio geralmente não é recomendado (International Conference on Harmonisation 2012c).

14.5. Teste de fototoxicidade *in vivo* – Administração ocular

Atualmente, não há padronização dos estudos não-clínicos em modelos *in vivo* para a avaliação da fototoxicidade após a administração ocular (International Conference on Harmonisation 2012c).

14.6. Interpretação dos dados

A sensibilidade do 3T3 NRU-PT é inquestionável, e, se um composto for negativo neste ensaio sugere uma probabilidade muito baixa de ser fototóxica em seres humanos. No entanto, um resultado positivo no 3T3 NRU-PT não deve ser considerado como indicativo de um risco clínico provável fototóxico, mas sim uma bandeira para acompanhamento de avaliação (International Conference on Harmonisation 2012c).

Quando é observado um resultado positivo no teste 3T3 NRU-PT é necessário realizar um estudo de fototoxicidade *in vivo*, em animais ou seres humanos. Esse estudo avalia se o potencial identificado na fototoxicidade *in vitro* se traduz em uma significativa resposta *in vivo*. Um resultado negativo em um estudo *in vivo* devidamente realizado (ou em animais ou seres humanos) sobrepõe-se a um resultado positivo NRU-PT 3T3. Da mesma forma, quando se obtém um resultado positivo em estudo *in vivo* e um resultado negativo nos estudo clínico adequadamente realizado, os resultados clínicos superam os não-clínicos (European Medicines Agency 2002b; International Conference on Harmonisation 2012c).

A excitação das moléculas pela luz pode levar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Embora outros mecanismos de fototoxicidade sejam conhecidos, mesmo nestes casos, verifica-se que as ROS são tipicamente geradas. Sendo assim, a produção de ROS após irradiação com luz ultravioleta ou visível pode ser um indicador de potencial de fototoxicidade. Testes de fotoestabilidade *per se* não podem determinar a existência de potencial toxicidade, sendo necessários outros testes (International Conference on Harmonisation 2012c).

Outro parâmetro farmacocinético muito importante é a concentração do fármaco teste no tecido/órgão no momento em que for exposto a luz. Essa concentração depende de vários fatores como concentração plasmática, perfusão do tecido, entre outros. Composto que possuem uma maior meia vida ou uma maior proporção de concentração plasma/tecido são mais propensos a produzir reações fototóxicas. Também é possível observar que o tempo e a concentração são fatores

fundamentais, pois quanto maior o tempo de exposição com uma dose crítica maior será o potencial risco de fototoxicidade (International Conference on Harmonisation 2012c).

Quando um ensaio de fototoxicidade *in vitro* apresenta resultado positivo um estudo *in vivo* deve ser feito para avaliar se o potencial fototóxico identificado *in vitro* está relacionado com uma resposta *in vivo*. Sendo assim, se o resultado *in vivo* (em animais ou seres humanos) for negativo, em um estudo adequadamente conduzido, substitui o resultado positivo do estudo *in vitro* (International Conference on Harmonisation 2012c).

Os sinais iniciais de fototoxicidade induzida pelo composto teste geralmente são eritema seguido de edema na dose de irradiação sub-eritemogênica. O tipo de resposta encontrada no teste irá depender do composto teste. Qualquer reação identificada de fototoxicidade deve ser avaliada quanto a dose e a dependência do tempo de exposição e, se possível, a NOAEL deve ser estabelecida. A avaliação do risco pode ser reforçada por parâmetros adicionais. (International Conference on Harmonisation 2012c).

Em alguns casos, o estudo de fototoxicidade na retina deve ser realizado, geralmente quando há suspeitas de substâncias que absorvem luz acima de 400 nm. Se justificado, a fototoxicidade da retina deve ser avaliada em modelos animais estabelecidos usando uma análise histopatológica (International Conference on Harmonisation 2012c).

15. Medicamentos Oncológicos

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

ICH S9 - Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals

Anvisa – NÃO APLICAVEL

A primeira *guideline* publicada pela ICH para a avaliação de medicamentos oncológicos foi no ano de 2009, intitulado ICH S9 - *Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals*. A proposta deste guia é prover informações que auxiliem o desenvolvimento de estudos não-clínicos com essa classe de medicamentos, tais dados darão suporte aos estudos clínicos em pacientes com estado avançado da doença ou que possuam opções terapêuticas limitadas (International Conference on Harmonisation 2009b).

No Brasil, no ano de 2003 a Anvisa, por meio da Gerência de Medicamentos Novos, Pesquisa e Ensaios Clínicos (GEPEC), publicou um esclarecimento acerca do registro de antineoplásicos novos. Foi informado que a necessidade de evidências de eficácia e segurança para registro é comum a todas as agências, mas algumas desenvolveram mecanismos de aprovação acelerada, baseados em evidências sugestivas mas ainda não conclusivas sobre a eficácia e segurança do medicamento teste. Tais mecanismos de aprovação exigem acompanhamento de perto pela agência, uma vez que são condicionados à apresentação de evidências adicionais de eficácia e segurança, as quais são obtidas em grande parte por ensaios clínicos ainda em execução. Segundo a Anvisa, os dados apresentados nesses estudos (*não-clínico* e clínico) sobre eficácia são considerados insuficientes para aprovação e comercialização no país (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2012b).

A legislação brasileira não prevê a existência de registros acelerados, o aumento do rigor vem de encontro com a preocupação de prover segurança sanitária a população em relação aos medicamentos disponibilizados no mercado. Até o momento a Anvisa não modificou a sua legislação, esclarecendo que a adoção de tal procedimento exigirá uma organização e capacidade de acompanhamento desses produtos que a agência ainda não possui (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2012b).

O cancro é uma doença associada a uma alta taxa de mortalidade, além de apresentar uma terapia de eficácia limitada. Dessa forma, aos casos mais avançados é necessário a disponibilidade de novos fármacos que apresentem eficácia elevada de uma forma mais rápida. A *guideline* ICH S9 tem como objetivo acelerar e facilitar o desenvolvimento de fármacos oncológicos e proteger os pacientes de reações adversas desnecessárias durante o tratamento, evitando assim o uso desnecessário de animais nos estudos não-clínicos (princípio dos 3Rs). Geralmente o desenvolvimento dessa classe de medicamentos segue o restante dos guias existentes para o estudo não-clínico, porém em situações específicas, com indicação para estágios avançados, as recomendações de pesquisa seguem o guia ICH S9 (International Conference on Harmonisation 2009b).

Os estudos não-clínicos avaliarão (International Conference on Harmonisation 2009b):

- Identificação das propriedades farmacêuticas;
- Estabelecimento da dose inicial segura – primeira dose em humanos;
- Entendimento do perfil toxicológico, isto é, identificação dos tecidos/órgãos alvos, relação exposição-resposta e reversibilidade.

15.1. Modelo animal

Em geral, os estudos utilizarão modelos *in vitro* (células/tecidos do tumor em estudos) e modelos *in vivo* roedores e não-roedores. A utilização e escolha de tais modelos poderão variar segundo o estudo toxicológico realizado (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.2. Duração

Os estudos não-clínicos com duração de 3 meses são considerados suficientes para dar suporte aos estudos clínicos de fase III e registro do medicamento (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.3. Farmacologia e Farmacologia de Segurança

Esse estudo deve ser realizado antes de iniciar os estudos clínicos de fase I, caracterizando preliminarmente o mecanismo de ação. Modelos animais apropriados deverão ser escolhidos baseados no tecido e no mecanismo de ação do fármaco e na doença. Isto é, o estudo deverá usar o mesmo tipo de tumor para a realização dos estudos. O escalonamento das doses em animais para uma dose equivalente humana está geralmente baseada na normalização da área de superfície corporal. Este estudo deverá evidenciar o princípio, o regime e o escalonamento do esquema terapêutico, fornecer informações sobre seleção de espécie animal, orientar na seleção da primeira dose em humanos, seleção de biomarcadores e se for o caso justificar associação medicamentosa (International Conference on Harmonisation 2009b).

Uma avaliação dos efeitos do novo fármaco em órgãos vitais deverá ser feita antes de iniciar os estudos clínicos, incluindo o sistema cardiovascular, respiratório e sistema nervoso central. Observações clínicas detalhadas seguidas de, dosagem e o exame eletrocardiográfico em não-roedores geralmente são considerados suficientes. Condução de estudos individualizados de farmacologia de segurança para dar suporte aos estudos clínicos não é geralmente necessário. Nos casos específicos em que o uso do fármaco pode promover significativo risco aos pacientes deverá ser considerado a realização de estudo de farmacologia de segurança conforme a ICH S7A e ICH S7B (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.4. Farmacocinética

É necessário a avaliação de parâmetros limitados de farmacocinética, como pico plasmático; área sob a curva (AUC) e semi vida, com a finalidade de facilitar a seleção e escalonamento de dose. Os dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção em animais devem ser avaliados em paralelo com os estudos clínicos (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.5. Toxicidade Geral

O objetivo primário dos estudos clínicos em pacientes com câncer avançado é a disponibilização segura da medicação. A fase I pode incluir avaliação de dosagem para a dose máxima tolerada e dose tóxica limite. Estudos toxicológicos para avaliação de NOEL e NOAEL não são consideradas para esse estudo. A avaliação de reversibilidade é realizada caso haja toxicidade grave próximo da dose de exposição clínica e a recuperação não possa ser prevista por avaliação científica, com o objetivo de avaliar se os efeitos tóxicos graves são reversíveis ou não (International Conference on Harmonisation 2009b).

No que respeita a moléculas químicas, os estudos são realizados em duas espécies alvo, roedores e não-roedores, mas em casos específicos o uso apenas de roedores é considerado suficiente (divisão celular rápida) (International Conference on Harmonisation 2009b).

Em esquema terapêutico que utilize mais do que um fármaco será obrigatório apresentar estudos toxicológicos individuais devidamente realizados. Em geral, estudos toxicológicos com a combinação terapêutica não são necessários para dar suporte ao registro. A escolha da combinação terapêutica deve ser devidamente explicada e comprovada, isto é, o estudo deve provar que existe aumento na eficácia na ausência ou sem aumento considerável de toxicidade. Caso seja necessário, deve-se realizar estudos toxicológicos utilizando os fármacos conjuntamente (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.6. Toxicidade Reprodutiva

Tais medicamentos são bem caracterizados cientificamente por causarem genotoxicidade ou pertencerem a classes de medicamentos que provocam grande toxicidade reprodutiva. Sendo assim, os estudos de toxicologia de fertilidade embriofetal (desenvolvimento embrionário precoce) não são considerados essenciais para dar suporte aos estudos clínicos e registro. Mas pode ser realizado o estudo de toxicidade embriofetal para avaliação do potencial risco embriofetal nos casos em que haja pacientes grávidas ou que possam engravidar. Esse estudo deverá ser realizado conforme o guia ICH S5-R2 (International Conference on Harmonisation 2009b).

A dose pediátrica será escolhida levando em consideração a dose para adultos, isto é, será uma fração da dose em adultos considerada segura. Estudos em animais jovens geralmente não são realizados para dar suporte a inclusão de pacientes pediátricos nos estudos clínicos, tais animais são estudados apenas quando os dados de segurança humana e estudos anteriores em animais são considerados insuficientes para uma avaliação de segurança em população pediátrica (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.7. Genotoxicidade

Estudos de genotoxicidade não são necessários para dar suporte aos estudos clínicos, mas devem ser realizados para dar suporte ao pedido de registro do medicamento seguindo a *guideline* ICH S2-R1. Se for evidenciado resultado positivo em modelos *in vitro*, modelos animais *in vivo* podem não ser necessários (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.8. Imunotoxicidade

Para a maioria dos fármacos oncológicos, o desenho de estudos de toxicidade geral são considerados suficientes para avaliação de imunotoxicidade e

assim dar suporte ao pedido de registro. Para fármacos imunomoduladores podem ser acrescentados novos parâmetros ao estudo (International Conference on Harmonisation 2009b).

15.9. Fototoxicidade

Uma avaliação inicial de fototoxicidade deve ser realizada antes dos estudos clínicos de fase I, baseado nas propriedades fotoquímicas da molécula e de outros membros da mesma classe terapêutica. Se for evidenciado um potencial fototóxico medidas de proteção adequadas devem ser adotados nos estudos clínicos. Porém se o risco não puder ser adequadamente evidenciado por dados da literatura ou experiência clínica, a avaliação de fotosegurança deverá ser feita seguindo as diretrizes da ICH M3-R2 antes da comercialização (International Conference on Harmonisation 2009b).

16. Associações em Dose Fixa

Guidelines analisadas

ICH M3 (R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals

EMA/CHMP/SWP/258498/2005 - *Guideline on the non-clinical development on fixed combinations of medicinal products*

Anvisa – Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos

Anvisa - Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa

A primeira *guideline* criada para a combinação em dose fixa foi publicada pela EMA no ano de 2008, intitulada EMA/CHMP/SWP/258498/2005 - *Guideline on the Non-Clinical Development on Fixed Combinations of Medicinal Products*. Desde então este guia é o principal documento que direciona os estudos na Europa, além do guia geral ICH M3-R2 (2009) (European Medicines Agency 2008c).

No Brasil foram publicados dois guias pela agência reguladora nacional (Anvisa), no ano de 2010 e 2013, intitulados respectivamente de Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa e Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010a).

A intenção terapêutica da utilização de combinação de dois ou mais fármacos em dose fixa é de aumentar a eficácia ou segurança para o paciente por meio de interações positivas, farmacológicas ou farmacocinéticas, quando comparados com o seu uso isolado. O objetivo dos estudos *não-clínicos* é de dar suporte aos futuros estudos clínicos, avaliando as características do potencial sinérgico, potencialização ou efeitos antagonistas, além de verificar a ocorrência de efeitos tóxicos únicos dessa associação (European Medicines Agency 2008c).

Associações medicamentosas podem ser utilizadas em diferentes condições de saúde, e devem ter qualidade, segurança e eficácia comprovadas, com riscos e benefícios bem definidos. Os estudos não clínicos têm como objetivo caracterizar o efeito do uso combinado dos princípios ativos do ponto de vista farmacológico, farmacocinético e toxicológico, identificando efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos da associação. A combinação deve demonstrar ser segura e eficaz, em que todos os princípios ativos contribuem para o efeito terapêutico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

A associação em dose fixa é composta pela utilização de dois ou mais fármacos com indicação terapêutica para determinada doença. Podem ser embalados conjuntamente ou administrados em dose única (formulação farmacêutica única) com concentrações fixas de dose. A extensão e a concepção dos estudos *não-clínicos* necessários para dar suporte aos estudos clínicos irá depender dos dados disponíveis dos compostos a serem combinados, bem como a utilização clínica. Vários cenários são possíveis (European Medicines Agency 2008c; International Conference on Harmonisation 2009a):

- Combinação fixa de compostos já aprovados como terapêutica de associação livre;
- Combinação fixa de compostos registrados independentemente;
- Combinação fixa contendo uma ou mais molécula nova, isto é, combinação de uma molécula nova com fármacos já registrados ou combinação de uma ou mais moléculas novas. A combinação de novas moléculas pode ser tanto na fase tardia de desenvolvimento clínico (Fase III) como em fases iniciais (Fase I e II).

Para a maioria das combinações de duas entidades em Fase III ou já registradas, em que exista experiência clínica adequada em relação a coadministração dos fármacos, não será necessário a realização de estudos toxicológicos em animais com a associação, a menos que haja uma preocupação toxicológica significativa. Se houver tais preocupações os estudos toxicológicos

deverão ser realizados antes de iniciar os estudos clínicos com a combinação. De acordo com a Anvisa os estudos não clínicos serão dispensados quando a associação de princípios ativos já tenha sido extensivamente utilizada em humanos, na faixa terapêutica que se pretende registrar, por um longo período e, possua o seu perfil de segurança devidamente estabelecido (International Conference on Harmonisation 2009a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010a).

Para associação de duas ou mais entidades químicas em fase tardia de pesquisa ou já registradas em que não exista informação suficiente sobre a coadministração mas em que não ocorra preocupação toxicológica de acordo com dados disponíveis, estudos de toxicologia serão recomendados antes que o medicamento seja usado em grande escala ou por utilização crônica. Os testes não são recomendados para dar suporte a utilização em pequena escala ou para estudos clínicos de curta duração (estudos de fase dois de até 3 meses de duração) (International Conference on Harmonisation 2009a; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Outra situação abordada na ICH M3-R2, e não descrita nos guias da Anvisa, diz respeito a combinações entre uma entidade química em fase tardia de pesquisa ou já registrada, com uma entidade química em fase inicial de pesquisa e com dados de experiência clínica, em que não tenham sido identificadas preocupações toxicológicas de acordo com dados disponíveis. Nesta situação, estudos de toxicologia com a associação não são requisitados para dar suporte à aprovação de ensaios clínicos de até um mês de duração. Ensaios posteriores ou de maior duração clínica devem ser apoiados por testes *não-clínicos* utilizando a combinação. Para a combinação de mais de uma entidade química em fase inicial de estudo é necessário a realização dos estudos toxicológicos para dar suporte aos ensaios clínicos (International Conference on Harmonisation 2009a).

Segundo a Anvisa, os estudos não-clínicos serão necessários quando (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010a):

- “A formulação possuir excipientes cuja segurança não esteja bem estabelecida ou quando o perfil de impurezas da associação é significativamente diferente dos produtos contendo as monodrogas;
- O perfil de segurança da associação ainda não estiver bem estabelecido;
- A faixa terapêutica proposta ainda não tiver sido estudada tanto para os princípios ativos isolados, como para os associados;

- Entre os princípios ativos da associação, um ou mais forem novos no país.”

Quando se tratar de associações com novas moléculas, os estudos não clínicos deverão seguir os mesmos procedimentos de aprovação seguidos com nova(a) molécula(a). Quando o perfil de segurança das novas moléculas individualmente ou em associação ainda não estiver estabelecido, estudos não clínicos deverão ser conduzidos para investigar possíveis efeitos toxicológicos aditivos ou sinérgicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2010a).

Segundo a Anvisa (2013), se existem dados toxicológicos para cada fármaco sugere-se uma avaliação de alguns fatores relevantes para determinar a segurança, identificando se há a necessidade de estudos não-clínicos adicionais e quais seriam eles. Esses fatores são (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013):

- Informações disponíveis sobre o uso da combinação em humanos;
- Possíveis interações farmacodinâmicas;
- Possíveis interações farmacocinéticas;
- Possíveis interações toxicológicas;
- Margem de segurança de cada fármaco;
- Sinergismo e antagonismo;
- Possíveis interações químicas;
- Possibilidade de um fármaco interferir na eficácia do outro

16.1. Modelo animal

Usualmente a avaliação não-clínica de uma associação poderá ser realizada em apenas uma espécie, sendo essa a mais relevante para o estudo conforme os dados de farmacodinâmica, farmacocinética, metabolismo, órgão alvo, sensibilidade e toxicologia. Testes adicionais em outras espécies podem ser necessários caso um efeito tóxico não esperado seja identificado (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

16.2. Dosagem

Na Europa é desejável que os estudos não clínicos sejam concebidos de tal forma que o intervalo de doses englobe uma antecipação de situações clínicas em humanos, porém deve-se evitar ao mesmo tempo a utilização de altas doses por, na maioria dos casos, serem irrelevantes para a avaliação de segurança. Deve-se escolher diferentes doses para cobrir e permitir uma administração segura de diferentes razões de concentração fármaco-fármaco dos ensaios clínicos, mesmo que apenas uma dosagem seja selecionada para a comercialização (European Medicines Agency 2008c).

Em certas situações a dosagem pretendida para humanos poderá ser tóxica em animais. Sendo assim, o ajuste de doses em proporções necessárias para permitir uma exposição adequada em animais pode ser realizada (European Medicines Agency 2008c).

Tais dados não foram abordados no guia da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

16.3. Duração

A mesma informação pode ser observada nos guias brasileiros e europeu. Para os estudos clínicos com a associação, os estudos de toxicidade devem ter duração equivalente à pretendida para os estudos clínicos, tendo um limite máximo de 90 dias. Para o registro, estudos com 90 dias de duração podem ser considerados para indicação de uso crônico. A necessidade de estudos mais longos ou adição de nova espécie ao estudo dependerá dos efeitos observados na utilização da combinação, farmacodinâmica, segurança e do conhecimento existente. Quando a indicação for para curta duração, os estudos toxicológicos de curta duração poderão ser justificados (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

16.4. Genotoxicidade

Os estudos de genotoxicidade com a combinação medicamentosa não serão necessários se os fármacos foram testados individualmente conforme legislação existente. Se existe alguma preocupação sobre genotoxicidade de uma substância na combinação uma avaliação adicional poderá ser necessária para verificação do potencial de potenciação. A avaliação da genotoxicidade deve ser realizada caso a caso, levando em consideração as informações disponíveis dos componentes e a possível potencialização da genotoxicidade em relação ao risco-benefício da combinação (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

16.5. Carcinogenicidade

Quando a combinação for composta por fármacos não carcinogênicos, tais estudos não serão necessários para testar a combinação. Se houver algum fármaco com potencial carcinogênico na formulação a realização desse estudo deverá ser cuidadosamente analisado, uma vez que a interação dos dois fármacos podendo potencializar o potencial carcinogênico do fármaco da associação. Quando a associação incluir um novo fármaco, idealmente testes de carcinogenicidade com a combinação deverão ser realizados em um grupo de animais conjuntamente com os estudos realizados para o registro do medicamento isoladamente (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Há a necessidade de fazer estudos de carcinogenicidade para associações com indicação para uso crônico, quando nos achados não-clínicos for observada incidência estatisticamente significativa de lesões pré-neoplásicas em órgãos ou tecidos (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

16.6. Estudos de toxicidade reprodutiva

Quando existirem dados de toxicidade de reprodução obtidos com os componentes individuais da associação não será necessário a realização de novos testes com a associação. Entretanto, a decisão dependerá da natureza e propriedades dos fármacos envolvidos na combinação e seus potenciais de interação. Nos casos em que a população alvo incluir mulheres em idade fértil e os estudos individuais dos fármacos da combinação apontam para risco embriofetal, não será recomendado o estudo toxicológico para avaliar o potencial risco. Se os estudos de desenvolvimento embriofetal dos fármacos não demonstraram nenhum risco ao desenvolvimento humano os estudos não-clínicos somente precisarão ser feitos se houver alguma suspeita com base nas propriedades de cada fármaco e no risco do uso da combinação para humanos (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Quando necessário, o estudo pode ser conduzido na espécie mais apropriada, baseando-se no conhecimento prévio que se tem dos fármacos. Se for evidenciado risco significativo somente para um determinado trimestre da gravidez, pode ser necessário realizar os estudos para avaliar os efeitos toxicológicos durante outros trimestres (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

16.7. Estudos de farmacologia de segurança

Os estudos de farmacologia de segurança com a associação geralmente não são necessários se os fármacos da formulação já tiverem sido adequadamente testados individualmente. Caso seja necessário, a decisão irá depender da antecipação de interações que possa ocorrer entre os princípios ativos (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

Segundo a *guideline* EMEA/CHMP/SWP/258498/2005 a realização de estudos de farmacologia de segurança específicos a alguns parâmetros (por exemplo: toxicidade no mesmo órgão alvo, toxicidade específica da classe terapêutica, população de risco) podem ser necessários antes do início dos ensaios

clínicos. Esse dado não foi evidenciado no guia da Anvisa (European Medicines Agency 2008c; Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013).

17. Conclusão

Através da análise comparada entre os guias existentes na Europa e o guia brasileiro, editado pela ANVISA, pôde-se estabelecer um paralelo entre as principais diferenças existentes nas exigências formuladas pelas agências reguladoras europeia e brasileira acerca dos estudos a realizar na pesquisa não-clínica de medicamentos de uso humano. Na última década a indústria farmacêutica nacional vem fazendo avanços na área de inovações, e com isso surge a necessidade de otimizar a atuação da agência reguladora no controle e fiscalização dos estudos realizados no desenvolvimento de um novo fármaco.

Estímulos governamentais, programas de incentivo à inovação e à interação entre as empresas farmacêuticas e instituições de ciência e tecnologia (ICT), implementados nos últimos anos no Brasil, têm levado a um aumento significativo na quantidade de investimentos em inovação. No entanto, apesar dos novos programas governamentais, o nível de investimento em I&D continua a ser muito baixo. Uma das principais razões para isso é a especialização de muitas empresas nacionais na produção de medicamentos genéricos. Como consequência, há uma grande diferença entre os gastos em I&D nas empresas farmacêuticas brasileiras e a média mundial do sector. O gasto médio no setor farmacêutico a nível mundial é de cerca de 15%, enquanto no Brasil é significativamente menor, cerca de 1,27% (Klein et al. 2011).

A comparação realizada neste trabalho entre as legislações sanitárias existentes para os estudos não-clínicos, permitiu observar que os procedimentos envolvidos nessa etapa no Brasil ainda se encontram muito burocratizados e a atuação da agência reguladora nacional ainda está limitada. Os testes *não-clínicos*, entre outras etapas, apresentam um grande peso no desenvolvimento de novos compostos, além de exigirem elevados investimentos em máquinas, instalações e mão-de-obra especializada. Além disso, a regulação internacional é extremamente

complexa, exigindo o cumprimento de Boas Práticas de Laboratório e a realização de testes de acordo com os principais guias internacionais (ICH).

No Brasil, o deslocamento das empresas nacionais em direção à I&D de novos medicamentos ainda é recente, demonstrando que a demanda interna por testes *não-clínicos* ainda pode ser considerada incipiente. Ao mesmo tempo, o Inmetro e a Anvisa caminham em direção à harmonização com a legislação internacional, o que demonstra que os avanços estão ocorrendo, de forma concomitante, entre as empresas farmacêuticas e os órgãos regulatórios. Porém como pôde ser visto no trabalho, a harmonização ainda é realizada de forma lenta e não caminha concomitantemente com os órgãos regulatórios internacionais, isto é, não acompanham as atualizações e modificações em tempo real realizadas por órgãos como o ICH, tornando os guias brasileiros não coincidentes e conflitantes com os testes solicitados em outros países.

Após a análise de cada estudo exigido para a pesquisa não-clínica foi possível observar inúmeros pontos não completamente coincidentes, principalmente com os guias europeus mais recentes ou que passaram por revisão recentemente. Embora o guia publicado pela Anvisa seja um documento atual, publicado em 2013, muitos dos estudos destacados estão desatualizados quando comparados com os guias da ICH em vigor, principalmente os publicados/revisados após o ano de 2009. Tal desatualização pode gerar problemas para as empresas nacionais, pois ao tentarem registrar seus medicamentos no mercado exterior podem encontrar obstáculos com base em estudos não-clínicos não condizentes com a atual legislação do país de interesse.

As empresas nacionais encontram inúmeras barreiras ao tentar viabilizar sua inserção no mercado global, sejam elas comerciais ou regulatórias. A quebra da dependência tecnológica das empresas nacionais, promovendo uma mudança estrutural da economia e do padrão exportador nos países em desenvolvimento como o Brasil, não é uma tarefa fácil, dependendo amplamente das políticas regulatórias existentes e de um sistema de inovações adequado.

A política utilizada no país referente a flexibilização da regulação frente à tentativa de incentivar a indústria nacional já demonstrou que não funciona, como exemplo temos a quebra de patentes na década de 70, com o objetivo de incentivar

o crescimento da indústria nacional. Tal ato conseguiu apenas incentivar a produção de medicamentos já existentes no mercado exterior (chamados me too ou similares), demonstrando pouco ou nenhum investimento na área de maior interesse: inovação.

No nosso entender o sistema industrial Brasileiro poderá beneficiar fortemente de uma aproximação entre as legislações nacional e ICH. No entanto, o tempo de adequação a nova legislação é de extrema importância para a indústria farmacêutica, deverá ser feito mediante a implementação da nova legislação ou guia com um tempo de adequação já pré-determinado. Deste modo, a legislação é publicada tendo efeito apenas após o período de adaptação. Dessa forma a agência reguladora sinaliza o que precisa ser alterado e quais novas informações serão solicitadas, cabendo a indústria reformular e atualizar os futuros estudos.

No Brasil, a precariedade de regulação nesse setor incentiva a realização de testes inadequados ou repetidos. Mas o maior problema reside na possível inviabilização de registro de medicamentos nacionais ou desenvolvidos nacionalmente nos mercados da Europa e EUA, ou em outros países que também possuam legislações harmonizadas. O objetivo da revisão dos guias utilizados atualmente no Brasil prende-se com a necessidade de estarem em concordância com os principais avanços e descobertas tecnológicas nas regiões líder como a ICH.

Uma legislação harmonizada e atualizada, com as principais agências reguladoras mundiais, poderá auxiliar e facilitar a aprovação do registro nesses países, além de agregar maior confiabilidade nos dados gerados em estudos realizados de forma adequada. Dada a influência do Brasil nos outros países da América Latina, a harmonização da legislação brasileira com a internacional, com a elevação dos padrões aplicados ao desenvolvimento de medicamentos irá contribuir para a evolução dos mesmos sistemas naqueles países na mesma direção.

18. Anexo I

Farmacologia de Segurança

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3-R2 – 2009 ICH S7A – 2001 ICH S7B - 2005
Modelo Animal	<p>Sistema Nervoso - O mais relevante</p> <p>Sistema Cardiovascular (eletrofisiológico) <i>in vitro</i> - preparações celulares e de tecidos de coelho, furão, cobaia, cão, suíno e ocasionalmente humano. Teste de repolarização não deve ser feito em tecido de rato ou ratinho</p> <p><i>in vivo</i> - espécie mais relevantes – cão, macaco, suíno, coelho ou cobaia, Teste de repolarização não deve ser feito em tecido de rato ou ratinho</p>	<p>Sistema Nervoso O mais relevante</p> <p>Sistema Cardiovascular (eletrofisiológico) <i>in vitro</i> - preparações celulares e de tecidos de coelho, furão, <i>guinea pig</i>, cão, suíno e ocasionalmente humano. Teste de repolarização não deve ser feito em tecido de rato ou ratinho</p> <p><i>in vivo</i> - espécie mais relevantes – cão, macaco, suíno, coelho ou <i>guinea pig</i>, Teste de repolarização não deve ser feito em tecido de rato ou ratinho</p>
Via de administração	Preconizada para uso humano	Preconizada para uso humano. Porém outras vias podem ser consideradas
Dose	Administração em dose única Concentração não especificada	Dose única Equiparáveis a dose necessária para provocar o efeito primário farmacodinâmico na espécie alvo ou o efeito terapêutico em seres humanos
Período de Observação	Tempo necessário para avaliação das concentrações plasmáticas, avaliação do composto teste e seus metabolitos major	Tempo necessário para avaliação das concentrações plasmáticas, avaliação do composto teste e seus metabolitos major

Parâmetros a serem avaliados	Sistema cardiovascular: atividade motora, modificações comportamentais, coordenação, respostas reflexas sensorio-motoras e temperatura corporal	Sistema Cardiovascular: atividade motora, modificações comportamentais, coordenação, de respostas reflexa (sensorial/motora) e temperatura corporal
	Sistema respiratório: frequência respiratória e outras medidas respiratórias	Sistema respiratório: frequência respiratória e outras medidas respiratórias
	Sistema cardíaco: pressão sanguínea; frequência cardíaca; eletrocardiograma, contração ventricular, resistência vascular, efeitos endógenos e/ou exógenos de substâncias na resposta cardíaca, repolarização e anomalias de condução	Sistema cardíaco: pressão sanguínea; frequência cardíaca; eletrocardiograma, contração ventricular, resistência vascular, efeitos endógenos e/ou exógenos de substâncias na resposta cardíaca, repolarização e anomalias de condução
Observações	Testes adicionais (quando necessário)	Testes adicionais (quando necessário)
	Sistema Respiratório: resistência de vias aéreas, pressão arterial pulmonar, pH sanguíneo, gasometria;	Sistema Respiratório: resistência de vias aéreas, pressão arterial pulmonar, pH sanguíneo, gasometria;
	Sistema Cardiovascular: débito cardíaco, contratilidade ventricular, resistência vascular, efeitos de substâncias endógenas e/ou exógenas sobre as respostas cardiovasculares;	Sistema Cardiovascular: débito cardíaco, contratilidade ventricular, resistência vascular, efeitos de substâncias endógenas e/ou exógenas sobre as respostas cardiovasculares;
	Sistema Nervoso Central: farmacologia comportamental, aprendizado e memória, exames visuais, auditivos, ligantes específicos, neuroquímica e/ou eletrofisiologia;	Sistema Nervoso Central: farmacologia comportamental, aprendizado e memória, exames visuais, auditivos, ligantes específicos, neuroquímica e/ou eletrofisiologia;
	Sistema Gastrointestinal: secreção gástrica, potencial prejuízo gastrointestinal, secreção biliar, tempo de trânsito <i>in vivo</i> , contração ileal <i>in vitro</i> , pH gástrico;	Sistema Gastrointestinal: secreção gástrica, potencial prejuízo gastrointestinal, secreção biliar, tempo de trânsito <i>in vivo</i> , contração ileal <i>in vitro</i> , pH gástrico;
Sistema Renal/Urinarío: volume urinário, gravidade específica, osmolalidade, pH, fluidos/balço eletrolítico, proteínas, citologia, hemácias, determinações químicas de ureia, creatinina, proteínas plasmáticas;	Sistema Renal/Urinarío: volume urinário, gravidade específica, osmolalidade, pH, fluidos/balço eletrolítico, proteínas, citologia, hemácias, determinações químicas de ureia, creatinina, proteínas plasmáticas;	

Sistema Nervoso Autônomo: ligação à recetores relevantes para o sistema nervoso autônomo, respostas funcionais para agonistas ou antagonistas *in vivo* ou *in vitro*, estimulação direta dos nervos autônomo, respostas cardiovasculares e variabilidade do ritmo cardíaco;

Outros Sistemas: musculatura esquelética, funções imunes e endócrinas

Sistema Nervoso Autônomo: ligação à recetores relevantes para o sistema nervoso autônomo, respostas funcionais para agonistas ou antagonistas *in vivo* ou *in vitro*, estimulação direta dos nervos autônomo, respostas cardiovasculares e variabilidade do ritmo cardíaco;

Outros Sistemas: musculatura esquelética, funções imunes e endócrinas

Farmacocinética e Toxicocinética

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 - 2009 ICH S3A - 1994 ICH S3B - 1994
Modelo Animal	O mesmo modelo animal utilizado em outros estudos toxicológicos	O mesmo modelo animal utilizado em outros estudos toxicológicos
Via de administração	Preconizada para uso humano	Preconizada para uso humano, outras vias devem ser justificadas
Dose	Baixa Intermediária Alta Colheita: quantas necessárias	Baixa Intermediária Alta Colheita: geralmente de 4 a 8 vezes
Período de observação	Suficiente para observar a toxicocinética no modelo animal estudado	Suficiente para observar a toxicocinética no modelo animal estudado
Parâmetros a serem avaliados	Exposição sistêmica Concentração plasmática C_{max} C_{tempo} Máxima dose tolerada AUC	Exposição sistêmica Concentração plasmática C_{max} C_{tempo} Máxima dose tolerada AUC

Dose Única

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S4 - 1998 CPMP/SWP/1042/99 (R1)- 2010
	Estudos de toxicidade de dose única, segundo a Anvisa, devem ser realizados separadamente	Estudos de toxicidade de dose única não são solicitados separadamente pela ICH. A toxicidade aguda pode ser estudada integrada aos estudos de toxicidade de dose reiterada
Modelo Animal	Duas espécies de mamíferos (roedora e não roedora). Números iguais de machos e fêmeas.	Duas espécies de mamíferos (roedora e não roedora). Números iguais de machos e fêmeas
Via de administração	Preconizada para uso humano e parenteral	Preconizada para uso humano, outras vias devem ser justificadas
Dose	Dose limite – 1000 mg/Kg/dia Em casos que a dose clínica não resulte em exposição adequada ou concentração terapêutica exceda 1g – 2000 mg/Kg/dia ou máxima dose disponível	Dose limite – 1000 mg/Kg/dia Em casos que a dose clínica não resulte em exposição adequada ou concentração terapêutica exceda 1g – 2000 mg/Kg/dia ou MDT Dose 2000 mg/kg/dia com exposição sistêmica < dose clínica – dose pode ser maior que MDT
Período de observação	Até 14 dias após a administração (D1 – duas avaliações, D2 a D14 uma avaliação diária)	Até 14 dias após a administração (numero de avaliações diárias deve ser definido pela empresa)
Parâmetros a serem avaliados	Mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); latência, duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anatomo e histopatológicas	Mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); latência, duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anatomo e histopatológicas Exames oftálmicos, registros eletrocardiográficos (não roedores)

Dose Reiterada – Recomendações Gerais

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3-R2 – 2009 CPMP/SWP/1042/99-R1 – 2010 ICH S4 - 1998
Modelo Animal	Duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. Números iguais de machos e fêmeas.	Duas espécies de mamíferos, geralmente o rato e o não-roedor é o cão. Mas dependerá da espécie mais relevante. Roedores - 4 grupos de estudo, com no mínimo 20 animais (estudos de 4 semana) e 40 animais (estudos de 6 meses) Não roedores – 10 animais
Via de administração	Preconizada para uso humano. Via parenteral como via alternativa.	Preconizada para uso humano, outras vias devem ser justificadas. A frequência de administração é definida caso a caso.
Dose	Geralmente 3 doses – baixa, intermediária e alta. O limite máximo é de 1000 mg/Kg/dia, as demais doses são estabelecidas em sequência descendente sugerindo-se intervalos de 2 a 4 vezes	São 4 grupos com 3 doses – dose baixa, intermediária, alta e o grupo controle. Dose baixa - suficiente para produzir um efeito farmacodinâmico ou o efeito terapêutico desejado. Dose intermediária é definida como média geométrica entre as doses alta e baixa. Dose alta: 1000 mg/Kg/dia Grupo controle: veículo

<p>Duração dos Estudos Não-Clínicos</p>	<p>Estudos clínicos de 2 semanas – estudos não-clínicos com duração de 2 semanas em roedor e não roedor</p> <p>Estudos clínicos entre 2 semanas e 6 meses – mesma duração para os estudos não-clínicos em roedores e não roedores</p> <p>Estudos clínicos acima de 6 meses – estudos não clínicos com duração de 6 meses em roedores e 9 meses em não roedores</p>	<p><u>Estudos Para dar Suporte aos Estudos Clínicos</u></p> <p>Estudos clínicos de 2 semanas – estudos não-clínicos com duração de 2 semanas em roedor e não roedor</p> <p>Estudos clínicos entre 2 semanas e 6 meses – mesma duração para os estudos não-clínicos em roedores e não roedores</p> <p>Estudos clínicos acima de 6 meses – estudos não clínicos com duração de 6 meses em roedores e 9 meses em não roedores</p>
<p>Duração dos Estudos Clínicos</p>	<p>A Anvisa não determina diferenciação na duração dos estudos não-clínicos para os medicamentos de uso intermitente porém que são usados de forma repetida</p>	<p><u>Estudos Para dar Suporte ao Marketing (registro)</u></p> <p>Estudos clínicos de 2 semanas – estudos não-clínicos com duração de 1 mês em roedor e não roedor</p> <p>Estudos clínicos entre 2 semanas e 1 meses – estudos não-clínicos com duração de 3 meses em roedores e não roedores</p> <p>Estudos clínicos entre 1 a 3 meses – estudos não-clínicos com duração de 6 meses</p> <p>Estudos clínicos acima de 3 meses – estudos não-clínicos com duração de 6 meses em roedores e 9 meses em não roedores</p> <p>Nos casos em que a experiência clínica identifica um uso repetido para medicamentos de uso intermitente pode ser necessário um estudo de toxicidade crônica</p>
<p>Parâmetros a serem avaliados</p>	<p>Roedores: Mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água, patologia clínica (hematologia, bioquímica); duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anatomo e histopatológicas</p> <p>Não Roedores: Mortalidade; sinais</p>	<p>Ingestão de alimentos, comportamento geral, o peso corporal, parâmetros hematológicos, análise bioquímica, exames de urina e oftalmológica em ambas as espécies, eletrocardiograma. Todos os animais do estudo deverão passar por autópsia. Toxicocinética, metabolização. Os órgãos necropsiados são: glandula</p>

clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); oftalmologia; duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anatômicas e histopatológicas

adrenal, pâncreas, artéria aorta, osso e medula óssea, cérebro, intestino (ceco, colon e duodeno), duodeno, epidídimo, esófago, olho, vesícula biliar, glândula Harderian, coração, íleo, jejuno, rins, fígado, pulmão, linfonodo (s), da glândula mamária, ovário, glândula da paratireóide, nervo periférico, pituitária, próstata, glândula salivar, vesícula seminal, músculo-esquelético, pele, medula espinhal, baço, estômago, testículos, timo, glândulas da tireóide, traqueia, bexiga urinária, vagina, útero e outros órgãos ou tecidos com lesões (massas teciduais)

Genotoxicidade

1 - *In vitro*

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S2 – R1 – 2011
Modelo Animal	<p>Células bacterianas</p> <p><i>Salmonella typhimurium</i> TA98; <i>Salmonella typhimurium</i> TA100; <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535; <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 ou TA97 ou TA97a; <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 ou <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> ou <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101).</p> <p>Células de mamíferos: aberração cromossômica em metáfase, ensaios com micronúcleos e ensaio de mutação genica (MLA) em células de linfoma de ratinho cepa L5178Y cell Tk</p>	<p>Células bacterianas</p> <p><i>Salmonella typhimurium</i> TA98; <i>Salmonella typhimurium</i> TA100; <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535; <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 ou TA97 ou TA97a; <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 ou <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> ou <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101).</p> <p>Células de mamíferos: aberração cromossômica em metáfase, ensaios com micronúcleos e ensaio de mutação genica (MLA) em células de linfoma de ratinho cepa L5178Y cell Tk</p>
Dose	<p>Ames - 5 mg/placa</p> <p>Células de mamífero - concentrações máximas recomendáveis são 1 mM ou 0,5mg/mL</p>	<p>Ames - concentração máxima recomendada é de 5000 µg/placa (ou 5µL/placa para meios de cultura líquidos)</p> <p>Células de mamífero - concentrações máximas recomendáveis são 1 mM ou 0,5mg/mL Células bacterianas</p>
Observações	Não foi abordado	<p>Células de mamíferos</p> <p>Dano cromossômico - Tratamento com o composto teste é de 3 a 6 horas, com um tempo de amostragem de aproximadamente 1,5 ciclos celulares normais desde o início do tratamento</p> <p>Micronúcleos - Tratamento com o composto teste é de 3 a 6 horas, tempo de amostragem é de 1,5 a 2 ciclos normais desde o início do tratamento</p>

		MLA - tratamento com o composto é de 3 a 4 horas
Parâmetros a serem avaliados	Resultados claramente positivos e negativos	Resultados claramente positivos e negativos. Avaliação dos falsos positivos e negativos.

2 - *In vivo*

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S2 – R1 - 2011
Modelo Animal	<p>Teste de micronúcleos - roedores (camundongos ou ratos)</p> <p>Apenas um sexo, de preferência machos</p>	<p>Aberração cromossômica e micronúcleos em medula óssea ou sangue periférico de rato ou ratinho</p> <p>Apenas um sexo deve ser usados nos testes, geralmente aquele mais relevante. Caso o sexo não for relevante, o uso de machos é considerado adequado</p>
Via de administração	Via preconizada para uso humano	Preconizada para uso humano, o uso de outras vias devem ser justificados.
Dose	<p>Baixa, intermediária e alta</p> <p>Estudos de curta duração (1 a 3 administrações) – dose máxima recomendada é de 2000 Mg/Kg ou dose máxima tolerada. As doses intermediária e baixa devem ser de 2 a 3 vezes menor que a dose alta.</p> <p>Estudos de Longa duração (doses múltipla) - as mesmas doses dos estudos toxicológicos, isto é, máxima dose tolerada, 1000 mg/kg para estudos de 14 dias ou maiores, se esta dose é tolerada ou a dose que leve à saturação da exposição</p>	<p>Baixa, intermediária e alta</p> <p>Estudos de curta duração (1 a 3 administrações) – dose máxima recomendada é de 2000 Mg/Kg ou dose máxima tolerada. As doses intermediária e baixa devem ser de 2 a 3 vezes menor que a dose alta.</p> <p>Estudos de Longa duração (doses múltipla) - as mesmas doses dos estudos toxicológicos, isto é, máxima dose tolerada, 1000 mg/kg para estudos de 14 dias ou maiores, se esta dose é tolerada ou a dose que leve à saturação da exposição</p>

Período de observação	Não foi abordado	<p>Ensaio de micronúcleo integrado com estudos de múlti-semanas - coleta de amostras realizada no dia a seguir da administração final</p> <p>Dose reiterada - geralmente de 2 a 6 horas após a última administração</p> <p>Dose única - dois períodos de amostragem são usados – poucas horas e 24 horas após o tratamento</p>
Parâmetros a serem avaliados	<p>Resultados claramente positivos e negativos.</p> <p>Positivo - Dano genético direto e indireto - mutações gênicas, destruição e alterações numéricas e de recombinação cromossômica</p>	<p>Resultados claramente positivos e negativos.</p> <p>Positivo - Dano genético direto e indireto - mutações gênicas, destruição e alterações numéricas e de recombinação cromossômica</p>

Carcinogenicidade

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S1A – 1995 ICH S1B – 1997 ICH S1C – 2008
Fatores que determinam a necessidade da execução dos estudos de carcinogênese	Duração e exposição Causa para preocupação Genotoxicidade Via de exposição Extensão da exposição sistêmica Indicação e população alvo	Duração e exposição Causa para preocupação Genotoxicidade Via de exposição Extensão da exposição sistêmica Indicação e população alvo
Esquema Experimental	Estudo de longo duração em roedor suplementado com: Um estudo de curto ou médio duração em roedores <i>in vivo</i> que podem incluir modelos de iniciação/promoção em roedores, ou modelos de carcinogenicidade usando transgênicos ou roedores neonatais ou; Estudo a longo duração em uma segunda espécie roedora.	Estudo de longo duração em roedor suplementado com: Um estudo de curto ou médio duração em roedores <i>in vivo</i> que podem incluir modelos de iniciação/promoção em roedores, ou modelos de carcinogenicidade usando transgênicos ou roedores neonatais ou; Estudo a longo duração em uma segunda espécie roedora.
Modelo Animal Padrão	Estudo de longa duração: em rato (espécie preferencial) Estudo adicional, curto ou média duração: em modelos transgênicos ou roedores neonatais	Estudo de longo duração: em rato (espécie preferencial), ratinho ou hámster Estudo adicional, curto ou média duração: em modelos transgênicos (ratinhos). Linhagens transgênicas aceitáveis nos estudos são TgrasH2 e p53 +/- . O estudo deve ser conduzido em machos e fêmeas.
Via de administração	Preconizada para uso humano	Preconizada para uso humano
Dose	Não foram descritas	Dose baixa - não deve produzir sinal de toxicidade Dose intermediária - deve produzir sinais mínimos de toxicidade Dose alta – MDT Dose por via oral – dose limite é

		fixada em 1500 mg/Kg/dia (quando dose humana não ultrapassa 500 mg/dia). Se a dosagem para uso humano for maior que 500 mg/dia, a dose limite pode ser aumentada.
Período de observação	Rato - 24 meses Ratinho – mínimo 18 meses	1 - Longa duração: rato - 24 meses, ratinho – mínimo 18 meses 2 – Curta e média duração: 6 e 9 meses, respectivamente
Parâmetros a serem avaliados	Peso corporal, ingestão de alimento, sinais evidentes de toxicidade, massas palpáveis e oftalmoscopia. Monitoração dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e da urina. Histopatologia dos seguintes órgão e tecidos: Glândula Adrenal, Aorta, Medula Óssea, Cérebro inclusive cerebelo, Ceco, Colon, Duodeno, Epidídimo, Esôfago, Globo Ocular com Nervo Óptico, Vesícula Biliar, Coração, Íleo, Jejuno, Rim, Laringe, Fígado, Pulmão, Nódulos Linfáticos, Glândula Mamária (somente em fêmeas), Cavidade Nasal com Nasofaringe e Seio Paranasal, Ovário, Pâncreas, Glândula Paratireóide, Nervo Periférico, Pituitária, Glândula do Prepúcio e do Clitóris, Próstata, Reto, Glândula Salivar, Vesícula Seminal, Músculo Esquelético, Pele, Medula Espinhal, Baço, Estômago, Testículo, Timo, Glândula Tireóide, Língua, Traqueia, Bexiga Urinária, Útero, Vagina, Glândula de Zymbal com ouvido externo e massas tumorais.	Peso corporal, ingestão de alimento, sinais evidentes de toxicidade, massas palpáveis, e oftalmoscopia. Monitoração dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e da urina. Histopatologia dos seguintes órgão e tecidos: Glândula Adrenal, Aorta, Medula Óssea, Cérebro inclusive cerebelo, Ceco, Colon, Duodeno, Epidídimo, Esôfago, Globo Ocular com Nervo Óptico, Vesícula Biliar, Coração, Íleo, Jejuno, Rim, Laringe, Fígado, Pulmão, Nódulos Linfáticos, Glândula Mamária (somente em fêmeas), Cavidade Nasal com Nasofaringe e Seio Paranasal, Ovário, Pâncreas, Glândula Paratireóide, Nervo Periférico, Pituitária, Glândula do Prepúcio e do Clitóris, Próstata, Reto, Glândula Salivar, Vesícula Seminal, Músculo Esquelético, Pele, Medula Espinhal, Baço, Estômago, Testículo, Timo, Glândula Tireóide, Língua, Traqueia, Bexiga Urinária, Útero, Vagina, Glândula de Zymbal com ouvido externo e massas tumorais. Análise histopatológica não só da medula óssea, mas também dos ossos e fêmur, este último deve-se incluindo as articulações e além dos ovários, o oviduto (tubas uterinas). Alterações na função fisiológica Avaliação do potencial carcinogênico

Ocorrências de lesões neoplásicas (e lesões não neoplásicas e sua correlação);
Número de animais em risco e examinados;
Incidência de tumores associados com mesma origem histogênica, se aplicável avaliar a incidência de tumores considerados malignos;
A soma de tumores benignos e malignos no mesmo tecido quando aplicável;
Período de latência;
Aumento da incidência ou redução da latência de tumores malignos;
Aumento da incidência de tumores benignos
Indução dos tumores no local da administração do medicamento;
Significado biológico no aumento no aparecimento de tumores;

Toxicidade Reprodutiva

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S5 – R2 - 2005
Esquema Experimental	Não foram descritas	Mamíferos, não mamíferos, células, tecidos, órgãos ou cultura de organismos (<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>).
Modelo Animal Padrão	Fertilidade (machos e fêmeas) e desenvolvimento embrionário inicial em roedores (rato) Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna em roedores (rato) Desenvolvimento embriofetal em roedores (rato) e não roedores (coelho)	Fertilidade (machos e fêmeas) e desenvolvimento embrionário inicial em roedores (rato) Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna em roedores (rato) Desenvolvimento embriofetal em roedores (rato) e não roedores (coelho)
Frequência de Administração		Pelo menos uma vez ao dia (dependerá da avaliação cinética)

1 - Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial - implantação

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S5 – R2 - 2005
Modelo Animal	Uma espécie roedora – rato Proporção de macho e fêmea de 1:1	Uma espécie roedora – rato Proporção de macho e fêmea de 1:1 Fêmeas necessárias para obter de 16 a 20 ninhadas
Via de administração	Preconizada para uso humano	Preconizada para uso humano
Dose	Baixa, intermediária e alta. As concentrações devem ser as mesmas escolhidas para os estudos toxicológicos	Baixa, intermediária e alta. As concentrações devem ser as mesmas escolhidas para os estudos toxicológicos
Período de observação	Fêmea: período fértil, implantação e desenvolvimento dos estágios embrionários de pré-implantação. Macho: fase adulta para avaliação de efeitos funcionais que possam não ter sido detetados em exames histológicos do órgão reprodutor	Fêmea: período fértil, implantação e desenvolvimento dos estágios embrionários de pré-implantação. Macho: fase adulta para avaliação de efeitos funcionais que possam não ter sido detetados em exames histológicos do órgão reprodutor Exposição ao medicamento cessa ao término da implantação embrionária, abate ocorre após o dia 13 a 15 de gestação
Parâmetros a serem avaliados	Avaliações: maturação de gametas, comportamento no acasalamento, fertilidade, estágio de préimplantação embrionária, implantação. Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, mudança de peso e tamanho corporal, consumo de comida, manchas vaginais, observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade. Ao Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos (preservar epidídimo, ovários e útero de todos os animais para possível avaliação	Avaliações: maturação de gametas, comportamento no acasalamento, fertilidade, estágio de préimplantação embrionária, implantação. Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, mudança de peso e tamanho corporal, consumo de comida, manchas vaginais, observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade. Ao Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos (preservar epidídimo, ovários e útero de todos os animais para possível avaliação

histológica); contagem e viabilidade de esperma em epidídimo; contagem de corpo lúteo e implantação; vida e morte do feto	histológica); contagem e viabilidade de esperma em epidídimo; contagem de corpo lúteo e implantação; vida e morte do feto
---	---

2 - Desenvolvimento pré e pós natal, incluindo função materna

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S5 – R2 - 2005
Modelo Animal	Uma espécie roedora – rato	Uma espécie roedora – rato Tamanho do grupo necessário para identificar efeitos tóxicos
Via de administração	Pretendida para uso humano Fêmeas devem ser expostas à substância teste desde a implantação até o final da lactação	Pretendida para uso humano Fêmeas devem ser expostas à substância teste desde a implantação até o final da lactação
Dose	Semelhante aos estudos de fertilidade	Semelhante aos estudos de fertilidade
Período de observação	Desde a gravidez (implantação) até a lactação das fêmeas avaliadas	Desde a gravidez (implantação) até a lactação das fêmeas avaliadas
Parâmetros a serem avaliados	<p>Avaliações: Aumento da toxicidade relativa a fêmeas não prenhes, mortalidade pré e pós-natal dos filhotes, crescimento e desenvolvimento alterados, alterações funcionais dos filhotes, incluindo comportamento, maturidade (puberdade) e reprodução.</p> <p>Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, alteração de peso corpóreo, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade, duração da prenhez e parição.</p> <p>Ao Final do Estudo: Necropsia e avaliação macroscópica de todos os adultos, implantações, anormalidades. Contagem de fetos vivos e mortos e peso corpóreo ao nascimento, sobrevivência / crescimento / peso corporal pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, desenvolvimento físico, funções sensoriais e reflexas, comportamento da ninhada.</p>	<p>Avaliações: Aumento da toxicidade relativa a fêmeas não prenhes, mortalidade pré e pós-natal dos filhotes, crescimento e desenvolvimento alterados, alterações funcionais dos filhotes, incluindo comportamento, maturidade (puberdade) e reprodução.</p> <p>Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade (<u>pelo menos uma vez ao dia</u>), alteração de peso corpóreo (<u>pelo menos duas vezes por semana</u>), <u>ingestão de alimentos (pelo menos uma vez por semana)</u>, <u>duração da gravidez e parto</u>, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade, duração da prenhez e parição.</p> <p>Ao Final do estudo: necropsia de todos os adultos, implantações, anormalidades, morte/vida/peso corpóreo ao nascimento, sobrevivência/ crescimento/peso corporal pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, desenvolvimento físico, funções sensoriais e reflexas, comportamento, <u>preservação e</u></p>

possível avaliação histopatológica de órgão com achados macroscópicos, manter órgãos correspondentes de controlo em número suficiente para análise comparativa

3 - Desenvolvimento embriofetal

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S5 – R2 - 2005
Modelo Animal	Espécie roedora – rato Espécie não roedora – coelho	Espécie roedora – rato Espécie não roedora – coelho
Via de administração	Pretendida para uso humano	Pretendida para uso humano
Dose	Semelhante aos estudos de fertilidade	A dosagem é a mesma para ambos os estudos de fertilidade
Período de observação	Período de tratamento compreende desde o momento da implantação até o fechamento do palato duro do feto Fêmeas devem ser submetidas à eutanásia e examinadas um dia antes do parto. Todos os fetos devem ser examinados quanto à viabilidade e anormalidade no dia do parto	Período de tratamento compreende desde o momento da implantação até o fechamento do palato duro do feto Fêmeas devem ser submetidas à eutanásia e examinadas um dia antes do parto. Todos os fetos devem ser examinados quanto à viabilidade e anormalidade no dia do parto 50% dos fetos de cada ninhada para o exame esquelético Roedor - alterações viscerais em no mínimo 50% dos fetos Não-roedor - alterações esqueléticas em 100% dos fetos
Parâmetros a serem avaliados	Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, alteração de peso corpóreo, consumo de ração, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade. Ao final do estudo: necrópsia com avaliação macroscópica de todos os adultos, contagem de corpos lúteos, número de implantações que resultaram em fetos vivos e mortos, peso corpóreo individual fetal, anormalidades fetais, avaliação da placenta, preservar órgãos com achados macroscópicos para possíveis avaliações histopatológicas e órgãos correspondentes em quantidade suficiente para comparação (controle)	Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade (<u>pelo menos uma vez ao dia</u>), alteração de peso corpóreo (<u>pelo menos duas vezes por semana</u>), consumo de ração (<u>pelo menos uma vez por semana</u>), observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade. Ao final do estudo: avaliações anatomo e histopatológicas de todos os adultos, contagem de corpo lúteo e implantação, peso corpóreo individual fetal, anormalidades fetais, avaliação da placenta, preservar órgãos com achados macroscópicos para possíveis avaliações histopatológicas e manter um órgão correspondente para comparação

(controle)

Reconhecimento do efeito, concordância dos dados entre espécies estudadas, tipo do efeito, multiplicidade dos efeitos, efeitos adversos nos vários estágios do processo reprodutivo, informações adicionais, ocorrência de efeitos raros, toxicidade materna, relação dose-resposta, comparação entre toxicologia reprodutiva e efeito farmacológico, comparação entre toxicidade e farmacodinâmica de dose efetiva, relação exposição humana e animal

Desenvolvimento não-clínico de Medicamentos Pediátricos

	Brasil	Europa
Legislação	Tema não abordado pela Avisa	ICH M3 – R2 – 2009 EMA/CHMP/SWP/169215/2005 – 2008
Fatores que determinam a necessidade da execução dos estudos	Não foi abordado	<ul style="list-style-type: none"> -Idade da população alvo; -Doenças que afetam população pediátrica; -Duração do tratamento; -Identificação de órgão e/ou tecidos alvos e o tempo de desenvolvimento do sistema em análise; -Farmacodinâmica primária em órgão e tecidos com desenvolvimento pós-natal significativo; -Dados relevantes de farmacocinética; -Existência de dados relevantes em humanos e animais adultos (clínicos e não-clínicos); -Observação de reações adversa ou irreversíveis; -Mecanismo de ação; -Dados relevantes em animais jovens observados em estudos com fármacos da mesma classe terapêutica.
Esquemas Experimentais	Não foi abordado	<p>Estudo <i>in vitro</i> utilizando tecido animal juvenil ou modelos específicos de doenças em animais jovens</p> <p>Espécie roedora – rato (preferencial) Espécie não roedora – cão Outras espécies podem ser escolhidas – espécie mais relevante</p>
Modelo Animal	Não foi abordado	A escolha da idade do animal e da duração do estudo dependerá do desenvolvimento do sistema/órgão alvo em que espera-se que o princípio ativo provoque toxicidade. Se o estudo for de longa duração o período de tratamento será de aproximadamente 13 semanas em ratos e 9 meses em cão
Via de administração	Não foi abordado	Pretendida para uso humano. Outra via pode ser escolhida, mas deverá ser justificada

Dose	Não foi abordado	<p>Baixa, intermediária e alta</p> <p>Dose alta - desenvolver toxicidade detetável, mas não resulte em toxicidade efetiva</p> <p>Dose baixa - preferencialmente resultar em uma exposição sistêmica (pré-clínica) similar a exposição clínica pretendida para essa população</p> <p>Dose intermediária - não será necessária caso a diferença entre a dose alta e baixa demonstre diferenças pequenas de toxicidade</p> <p>Adulto - dose comum que resulte em uma exposição sistêmica similar (comparação). Intervalo perto da NOEL ou NOAEL</p>
Período de Observação	Não foi abordado	13 semanas em ratos e 9 meses em cães
Parâmetros a serem avaliados	Não foi abordado	<p>Índice de crescimento, índices externos de maturação sexual, peso corporal, sinais físicos, peso dos órgãos, exames macro e microscópicos, exames laboratorial (hematológicos e bioquímicos) e exames histopatológicos</p> <p>Avaliação neurotóxica - avaliação do reflexo ontogênico, função sensorial motora, locomoção, reação, comportamento social e aprendizado e memória</p> <p>Avaliação Imunotóxica</p> <p>Avaliação Nefrotóxica - deverão monitorar parâmetros funcionais chave em urina.</p>

Tolerância local

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 CPMP/SWP/2145/00 - 2001 EMA/CHMP/SWP/708666/2010 - 2011
Modelo Animal	Espécie mais relevante	Espécie mais relevante
Via de administração	Pretendida para uso humano. Outra via pode ser escolhida, mas deverá ser justificada.	Pretendida para uso humano. Outra via pode ser escolhida, mas deverá ser justificada.
Dose	Real concentração de substância ativa utilizada em seres humanos A dose pode ser ajustada através da variação da frequência de administração	Real concentração de substância ativa utilizada em seres humanos A dose pode ser ajustada através da variação da frequência de administração Os mesmos excipientes utilizada em seres humanos
Período de Observação	A frequência e a duração da administração aos animais deverão ser determinadas pela proposta de administração, em condições de uso clínico Duração do teste não deve ser superior a 4 semanas	A frequência e a duração da administração aos animais deverão ser determinadas pela proposta de administração, em condições de uso clínico Duração do teste não deve ser superior a 4 semanas
Reversibilidade	Deve ser incluída a avaliações da reversibilidade das lesões locais deverão quando relevantes	Deve ser incluída a avaliações da reversibilidade das lesões locais deverão quando relevantes

<p>Vias de Administração Específicas</p>	<p>Dérmica – espécie escolhida é o coelho. Os estudos toxicológicos realizados são: dose única, reiterada e avaliação do potencial de sensibilidade</p> <p>Parenteral – frequência de administração, dose única e reiterada observação 48 e 96 horas após a administração</p> <p>Ocular - dose única ou dose reiterada. Dose única - realizado em coelhos. Olhos (um para o teste e o outro controle) examinados, no mínimo, 72 horas após a administração. Dose reiterada – realizado em coelhos com administração diária durante quatro semanas</p> <p>Retal - A administração do composto normalmente ocorre uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias, de acordo com a utilização clínica (cães ou coelhos)</p> <p>Vaginal - seleção das espécies deve ser justificada, geralmente cães e coelhos, também podem ser realizados em ratos. O volume de aplicação é baseado na dose terapêutica humana ou no volume máximo aplicável à espécie animal, A administração é realizada uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias</p>	<p>Dérmica – espécie escolhida é o coelho. Os estudos toxicológicos realizados são: dose única, reiterada e avaliação do potencial de sensibilidade. Em alguns casos teste de fotossensibilização</p> <p>Parenteral – frequência de administração, dose única e reiterada observação 48 e 96 horas após a administração. São consideradas vias parenterais: intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intratecal, subcutânea e vias paravenosas</p> <p>Ocular - dose única ou dose reiterada. Dose única - realizado em coelhos. Olhos (um para o teste e o outro controle) examinados, no mínimo, 72 horas após a administração. Dose reiterada – realizado em coelhos com administração diária durante quatro semanas</p> <p>Retal - A administração do composto normalmente ocorre uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias, de acordo com a utilização clínica (cães ou coelhos)</p> <p>Vaginal - seleção das espécies deve ser justificada, geralmente cães e coelhos, também podem ser realizados em ratos. O volume de aplicação é baseado na dose terapêutica humana ou no volume máximo aplicável à espécie animal, A administração é realizada uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias</p>
<p>Potencial de sensibilidade</p>	<p>Avaliação em <i>guinea pig</i> e linfonodos local (LLNA)</p>	<p>Avaliação em <i>guinea pig</i> e linfonodos local (LLNA)</p>

Imunotoxicidade

	Brasil	Europa
Legislação	Tema não abordado pela Avisa	ICH M3-R2 – 2009 ICH S8 - 2005
Modelo Animal	Não foi abordado	A espécie, estirpe, a dose, duração e via de administração utilizada devem ser compatíveis com o estudo de toxicidade padrão (dose reiterada) em que foi observado o efeito imunotóxico Testes adicionais – roedores tratados por 28 dias com o regime de dose reiterada
Dose	Não foi abordado	Testes adicionais - dose alta deve ser acima da dose NOAEL e abaixo da induza efeitos secundário por <i>stress</i>
Parâmetros avaliados	Não foi abordado	Hematológicos, alterações no sistema imune (Clinical Chemistry), aumento de incidência de infecções e tumores, peso dos órgãos envolvidos e histologia, Mudanças estatísticas e biológicas significantes, gravidade dos efeitos, relação dose/resposta, fator de segurança em relação a dose clínica, duração do tratamento, número de espécies e parâmetros afetados, alterações que podem ocorrer secundariamente a outros fatores, possíveis alvos celulares e/ou mecanismo de ação, doses que produzem essas mudanças em relação às doses que produzem outros efeitos tóxicos, reversibilidade dos efeitos.
Observações		Testes adicionais - avaliação qualitativa e quantitativa dos leucócitos

Fototoxicidade

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa - 2013	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S10 – 2012 CPMP/SWP/398/01 - 2002
Modelo Animal	Não foi abordado	<p>Fototoxicidade <i>in vitro</i> - modelo 3T3 NRU-PT, células fibroblásticas de ratinho, linhagem Balb/c 3T3, modelo 3D de reconstrução da pele <i>In vivo</i> – espécie mais relevante</p> <p>Fotoalergia Espécie não roedora – <i>guinea pig</i></p> <p>Não indicados pela nova revisão da ICH S10:</p> <p>Fotogenotoxicidade <i>In vivo</i> - testes em micronúcleos de medula óssea ou teste de aberração cromossômica</p> <p>Fotocarcinogenicidade <i>In vivo</i> – testes em ratinho albino SKH1 (hr/hr). Modelo <i>in vitro</i> mecanicistas de fotogenicidade</p>
Via de administração	Não foi abordado	Pretendida para uso humano. Outra via pode ser escolhida, mas deverá ser justificada.
Dose	Não foi abordado	Dose única ou reiterada de 1000 mg/kg/dia roedores e não roedores. Em determinados casos as doses devem ser limitadas a 10 vezes a margem de exposição clínica ou uma dose de 2000 mg/kg/dia ou o MFD, a que for menor
Período de Observação	Não foi abordado	A frequência e a duração da administração aos animais deverão ser determinadas pela proposta de administração, em condições de uso clínico

Vias de Administração Específicas	Não foi abordado	Tópica – formulação do fármaco e via de administração pretendida para humanos. Irradiação deve ser feita em um momento específico após aplicação (ser determinado pela empresa) Ocular – não há estudos padronizados
Parâmetros a serem avaliados	Não foi abordado	Fototoxicidade aguda (fotoirritação) e fotossensibilidade

Medicamentos Oncológicos

	Brasil	Europa
Legislação	Esclarecimentos sobre a posição da Anvisa quanto ao registro de medicamentos antineoplásicos novos - 2010	ICH M3 – R2 – 2009 ICH S9 - 2009
Modelo Animal	Estudo acelerado – não recomendado	<i>In vitro</i> - células/tecidos do tumor em estudos <i>In vivo</i> - roedores e não-roedores
Duração	Estudo acelerado – não recomendado	3 meses
Farmacologia de Segurança	Estudo acelerado – não recomendado	Realizar antes dos estudos clínicos Fase I
Farmacocinética	Estudo acelerado – não recomendado	Realizar em paralelo com estudos clínicos Avaliação: pico plasmático, AUC e meia vida
Toxicidade Reprodutiva	Estudo acelerado – não recomendado	Não são necessários – provocam grande toxicidade Fertilidade embrionária – quando indicado para pacientes grávidas ou que possam engravidar (ICH S5-R2) Animais jovens – quando dados existentes não forem suficiente para avaliação de segurança em população pediátrica
Genotoxicidade	Estudo acelerado – não recomendado	Não são necessários aos ensaios clínicos Resultados necessários para o CTD segundo a ICH S2
Imunofototoxicidade	Estudo acelerado – não recomendado	Estudos toxicológicos gerais Imunomoduladores – testes adicionais
Fototoxicidade	Estudo acelerado – não recomendado	Estudos antes da Fase I

Combinação em Dose Fixa

	Brasil	Europa
Legislação	Guia Anvisa – 2013 Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa - 2010	ICH M3-R2 – 2009 EMA/CHMP/SWP/258498/2005 – 2008
Modelo Animal	1 espécie Testes adicionais - outras espécies podem ser necessárias caso um efeito tóxico não esperado seja identificado	1 espécie Testes adicionais - outras espécies podem ser necessárias caso um efeito tóxico não esperado seja identificado
Dose	Não foi abordado	Intervalos de diferentes doses que englobem uma antecipação de situações clínicas em humanos
Duração	Duração equivalente à pretendida para os estudos clínicos, tendo um limite máximo de 90 dias	Duração equivalente à pretendida para os estudos clínicos, tendo um limite máximo de 90 dias
Genotoxicidade	Desnecessários – medicamentos testados isoladamente Recomendados – quando há alguma preocupação	Desnecessários – medicamentos testados isoladamente Recomendados – quando há alguma preocupação
Carcinogenicidade	Indicado para uso crônico se for evidenciado potencial carcinogênico de algum dos componentes da fórmula	Indicado para uso crônico se for evidenciado potencial carcinogênico de algum dos componentes da fórmula ou quando a associação for composta por um fármaco novo
Toxicidade Reprodutiva	Avaliação caso a caso Desnecessários – quando tais dados estiverem disponíveis para cada composto isoladamente Necessário – quando houver alguma suspeita	Avaliação caso a caso Desnecessários – quando tais dados estiverem disponíveis para cada composto isoladamente Necessário – quando houver alguma suspeita

Farmacologia de Segurança	Desnecessários – quando tais dados estiverem disponíveis para cada composto isoladamente	Desnecessários – quando tais dados estiverem disponíveis para cada composto isoladamente Necessário - realização de estudos específicos a alguns parâmetros (Ex.: toxicidade no mesmo órgão alvo, toxicidade específica da classe terapêutica, população de risco) podem ser necessários antes do início dos ensaios clínicos
----------------------------------	--	--

Bibliografia

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012a. Como a Anvisa avalia o registro de medicamentos novos no Brasil. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+novos/Como+a+Anvisa+avalia+o+registro+de+medicamentos+novos+no+Brasil> [Accessed May 6, 2012].
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012b. Esclarecimento sobre a posição da Anvisa quanto ao registro de medicamentos antineoplásicos novos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+novos/Esclarecimento+sobre+a+posicao+da+Anvisa+quanto+ao+registro+de+medicamentos+antineoplasicos+novos> [Accessed May 5, 2012].
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. , pp.1–48. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES> [Accessed April 10, 2013].
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010a. Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ed. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/979397004745767a8465d43fbc4c6735/Guia+para+Registro+de+Novas+Associa%C3%A7%C3%B5es+em+Dose+Fixa.pdf?MOD=AJPERES> [Accessed April 20, 2012].
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010b. Nota Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Pesquisa+clinica/20100303> [Accessed March 20, 2012].
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. RDC nº 136, de 29 de maio de 2003 - Dispõe sobre registro de medicamentos novos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, p.13.
- Bass, R., 2011. Non-Clinical Safety Sciences and Their Regulatory Aspects Procedures and guidelines. In *Reprotoxicity*. Lisbon: Drug Information Association – DIA.

- Cavagnaro, J.A., 2008. *Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals: a science-based approach to facilitating clinical trials* 1^o ed. J. A. Cavagnaro, ed., New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- European Medicines Agency, 2004. CHMP/CHMP/2592/02 R1 - Conclusions and Recommendations on the Use of Genetically Modified Animal Models for Carcinogenicity Assessment. *European Medicines Agency*, (June), pp.1–12. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003257.pdf [Accessed November 11, 2012].
- European Medicines Agency, 2010a. CPMP/SWP/1042/99 (R1)- Guideline on Repeated Dose Toxicity. *European Medicines Agency*, 99(March), pp.1–9. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf [Accessed November 11, 2011].
- European Medicines Agency, 2001. CPMP/SWP/2145/00 - Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. *European Medicines Agency*, (March), p.7. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/Concept_Paper/S10_Final_Concept_Paper_June_2010x.pdf [Accessed February 3, 2012].
- European Medicines Agency, 2002a. CPMP/SWP/2877/00 - Note for Guidance on Carcinogenic Potential. *European Medicines Agency*, (July), pp.1–8. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003258.pdf [Accessed November 14, 2011].
- European Medicines Agency, 2002b. CPMP/SWP/398/01 - Note for guidance on photosafety testing. *European Medicines Agency*, (June), p.8. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003353.pdf [Accessed November 12, 2011].
- European Medicines Agency, 2011a. EMA/CHMP/SWP/336670/2010 - Questions and answers on the “ Note for guidance of photosafety testing ”. *European Medicines Agency*, 44(March), p.5. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2011/04/WC500105109.pdf [Accessed November 11, 2011].
- European Medicines Agency, 2011b. EMA/CHMP/SWP/708666/2010 - Concept paper on the need for revision of the Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (CPMP/SWP/2145/00). *European Medicines Agency*, 44(July), p.4. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109476.pdf [Accessed November 13, 2011].

- European Medicines Agency, 2010b. EMA/CHMP/SWP/81714/2010 - Questions and answers on the withdrawal of the ' Note for guidance on single dose toxicity '. *European Medicines Agency*, 44(June), p.3. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094590.pdf [Accessed November 12, 2011].
- European Medicines Agency, 2008a. EMEA/CHMP/203927/2005 - Guideline on risk assessment of medicinal products on human reproduction and lactation: from data to labelling. *European Medicines Agency*, (July), p.18. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003307.pdf [Accessed November 11, 2011].
- European Medicines Agency, 2008b. EMEA/CHMP/SWP/169215/2005 - Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceutical for paediatric indications. *European Medicines Agency*, (January), p.9. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003305.pdf [Accessed November 12, 2011].
- European Medicines Agency, 2008c. EMEA/CHMP/SWP/258498/2005 - Guideline on the non-clinical development on fixed combinations of medicinal products. *European Medicines Agency*, (January), p.6. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003686.pdf [Accessed December 15, 2011].
- European Medicines Agency, 2006. EMEA/CHMP/SWP/94227/2004 - Guideline on the Non-Clinical Investigation of the Dependence Potential of Medicinal Products. *European Medicines Agency*, (March), p.12. Available at: http://www.cpdd.vcu.edu/Pages/Index/Index_PDFs/EMEAGuidelinesOnTheNonClinicalInvestigationOfTheDependencePotentialOfMedicinalProducts.pdf [Accessed May 1, 2013].
- European Medicines Agency, 2012. Non-clinical: Toxicology. *European Medicines Agency*. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000397.jsp&mid=WC0b01ac058002956f [Accessed May 10, 2012].
- European Parliament and of the Council, 2010. Directive 2010/63/UE - Protection of animals used for scientific purposes. *Journal of the European Union*, pp.33–79. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> [Accessed November 17, 2011].
- Food and Drug Administration, 2012. New Drug Development and Review Process. *Food and Drug Administration*. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/SmallBusinessAssistance/ucm053131.htm> [Accessed March 4, 2012].

- Fraga, H.C.R., 2011. *Implantação de um sistema da qualidade em um laboratório público de pesquisa: estudos da viabilidade e dos impactos*. Universidade Federal da Bahia. Available at: <http://www.mendeley.com/catalog/universidade-federal-da-bahia-1/>.
- Gad, S.C., 2008. *Preclinical Development Handbook: Toxicology* 1^o ed. S. C. Gad, ed., North Carolina: John Wiley & Sons, Inc.
- Han, C., Davis, C.B. & Wang, B., 2010. *Evaluation of drug candidates for preclinical development - pharmacokinetics, metabolism, pharmaceuticals, and toxicology* 1^o ed. C. Han, C. B. Davis, & B. Wang, eds., New Jersey: John Wiley & Sons, inc.
- International Conference on Harmonisation, 2012a. History: About ICH. *International Conference on Harmonisation*. Available at: <http://www.ich.org/about/history.html> [Accessed April 14, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 2012b. ICH M3 (R2) - questions and answers. *International Conference on Harmonisation*, 3(June), p.10. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Q_As/M3_R2_Q_A_R2_Step4.pdf [Accessed May 20, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 2009a. ICH M3(R2) - Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. *International Conference on Harmonisation*, 3(June), p.25. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2__Guideline.pdf [Accessed November 10, 2010].
- International Conference on Harmonisation, 2004. ICH M4 (R3) - Organisation of the Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *International Conference on Harmonisation*, p.16. Available at: http://desarrollos-preclinicos.gen-es.org/documents/M4_R3_CTD.pdf [Accessed April 25, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 2002. ICH M4S (R2) - Nonclinical Summaries and Organisation of Module 4. *International Conference on Harmonisation*, (December), p.115. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/CTD/M4__R2__Safety/M4S_R2_.pdf [Accessed March 1, 2013].
- International Conference on Harmonisation, 2012c. ICH S10 - Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. *International Conference on Harmonisation*, (November), p.17. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/S10_Step_2.pdf [Accessed March 1, 2013].

- International Conference on Harmonisation, 1995. ICH S1A - Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. *International Conference on Harmonization*, (November), p.8. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1A/Step4/S1A_Guideline.pdf [Accessed February 9, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 1997. ICH S1B - Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals. *International Conference on Harmonization*, (July), p.11. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1B/Step4/S1B_Guideline.pdf [Accessed February 9, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 2008. ICH S1C (R2) - Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. *International Conference on Harmonization*, 1994(October 1994), p.12. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1C_R2/Step4/S1C_R2_Guideline.pdf [Accessed February 13, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 2011. ICH S2 (R1) - Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for Human Use. *International Conference on Harmonization*, 2(November), p.29. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf [Accessed January 11, 2012].
- International Conference on Harmonisation, 1994a. ICH S3A - Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies. *International Conference on Harmonization*, (October), p.15. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/Step4/S3A_Guideline.pdf [Accessed November 11, 2011].
- International Conference on Harmonisation, 1994b. ICH S3B - Guidance for repeated dose tissue distribution studies. *International Conference on Harmonization*, (October), p.4. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3B/Step4/S3B_Guideline.pdf [Accessed November 11, 2011].
- International Conference on Harmonisation, 1998. ICH S4 - Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing). *International Conference on Harmonisation*, (September), p.4. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S4/Step4/S4_Guideline.pdf [Accessed November 16, 2011].
- International Conference on Harmonisation, 2005a. ICH S5 (R2) - Detection of toxicity to reproduction for medicinal products e toxicity to male fertility. *International Conference on Harmonization*, 5(June 1993), p.24. Available at:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5_R2/Step4/S5_R2_Guideline.pdf [Accessed January 29, 2012].

International Conference on Harmonisation, 2001. ICH S7A - Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. *International Conference on Harmonization*, (June), p.10. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf [Accessed November 11, 2011].

International Conference on Harmonisation, 2005b. ICH S7B - The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. *International Conference on Harmonization*, (May), p.14. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf [Accessed February 26, 2012].

International Conference on Harmonisation, 2005c. ICH S8 - Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals. *International Conference on Harmonisation*, (April 2005), p.13. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S8/Step4/S8_Guideline.pdf [Accessed November 13, 2011].

International Conference on Harmonisation, 2009b. ICH S9 - Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. *International Conference on Harmonisation*, (October), pp.1–13. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S9/Step4/S9_Step4_Guideline.pdf [Accessed April 26, 2012].

International Conference on Harmonisation, 2012d. M4 : The Common Technical Document. *International Conference on Harmonisation*. Available at: <http://www.ich.org/products/ctd.html> [Accessed April 20, 2012].

International Conference on Harmonisation, 2012e. Safety Guidelines. *International Conference on Harmonisation*. Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html> [Accessed April 14, 2012].

Klein, H.E., Hasenclever, L. & Machado, C.J.S., 2011. Regulação e difusão de tecnologias e sua influência na captação tecnológica em saúde dos países em desenvolvimento. *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Sociedade*, 2(2), pp.130–149. Available at: <http://www.revistabrasileiradects.ufscar.br/index.php/cts/article/viewFile/161/78>.

Kumar, M. & Longstreth, J., 2011. Risks and Benefits of Conducting Preclinical Studies in the Global Setting. *Regulatory Focus*, (December), pp.20–25. Available at:

https://www.amarexcro.com/articles/docs/RAPS_Focus_Preclinical_Global_Dec_2011.pdf [Accessed May 4, 2012].

Olejniczak, K., 2011. Non-Clinical Safety Sciences and Their Regulatory Aspects. In *Repeated dose*. Lisbon: Drug Information Association – DIA.

Pieroni, J.P. et al., 2009. Terceirização da P&D de medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil. *BNDES Setorial*, 29, pp.131–158. Available at: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/Set2904.pdf.

Radaelli, V., Andrade, C. & Furtado, J., 2009. Trajectory of Development Based on Innovation: The Pharmaceutical. *Maastricht University*, pp.1–20. Available at: http://www.merit.unu.edu/MEIDE/papers/2009/1236001150_VR.pdf [Accessed September 8, 2011].

Robinson, S. et al., 2009. Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals. *The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*, pp.1–36. Available at: <http://www.nc3rs.org.uk/document.asp?id=1317> [Accessed November 16, 2011].

Sennes, I., 2009. Inovação no Brasil: políticas públicas e estratégias empresariais. *Woodrow Wilson International Center for Scholars – Brazil Institute*, pp.1–42. Available at: <http://www.interfarma.org.br/site2/images/SiteInterfarma/Informacoesdosetor/Publicacoes/ProspectivainovacaoEstrategiasPublicasePrivadas.pdf> [Accessed May 7, 2012].

Silva Lima, B. & Van der Laan, J W, 2000. Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 32(2), pp.135–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067770> [Accessed March 26, 2013].

Silva-Lima, B. & Van der Laan, J. W., 2002. Current Status and Emerging Opportunities in Replacement of the Lifetime Mouse Cancer Bioassay. *Drug Information Journal*, 36(3), pp.645–657. Available at: <http://dij.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/009286150203600319>.

Vieira, V. da M. & Ohayon, P., 2006. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. *Revista Economia & ...*, pp.1–23. Available at: <http://periodicos.pucminas.br/index.php/economiaegestao/article/viewArticle/26> [Accessed May 4, 2012].