



Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Toxicologia

**Metodologias utilizadas para a realização de
estudos toxicológicos
e
Ofício Circular nº 002/2009/GGTOX**

Brasília, 11/12/09



**Agência Nacional
de Vigilância Sanitária**

www.anvisa.gov.br

Portaria MS Nº 03/92 de 16 de janeiro de 1992

*As provas e ensaios devem ser efetuados de acordo com as especificações publicadas pela **Organização Mundial da Saúde (OMS)**, Programa Internacional de Substâncias Químicas (**IPCS/OMS**), Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (**IARC/OMS**), Centro Panamericano de Ecologia Humana e Saúde (**ECO/OPS**), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (**FAO**), Registro Internacional de Substâncias Potencialmente Tóxicas do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (**IRPTC/UNEP**), Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia (**OECD/CEE**) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América.*



CRITÉRIOS

- ▶ Metodologias internacionalmente aceitas
 - comparabilidade
 - reprodutibilidade
 - avaliação de *end-points* relevantes
 - uniformidade de tratamento

CRITÉRIOS

→ resultados confiáveis

⇒ classificação toxicológica

⇒ Responsabilidades compartilhadas

⇒ proteção da saúde do trabalhador

⇒ proteção da saúde do consumidor.

▶ Novos protocolos e a harmonização internacional

▶ Outros desenhos de estudo (fora dos protocolos) devem ser previamente submetidos para aprovação

EXIGÊNCIAS

- ➔ 99% dos processos geram exigências de estudos
- ➔ responsabilidade do patrocinador do estudo
- ➔ cumprimento parcial de exigências
- ➔ Morosidade na análise de processos

Ofício N° 002/2009/GGTOX de 21/08/09

→ Informou

- ⇒ indeferimento dos pleitos de registro para produtos cujos estudos não seguiram os protocolos
- ⇒ submissão de novos estudos quando identificados este tipo de irregularidade

→ Todas as manifestações/dúvidas enviadas pelas empresas, laboratórios ou associações serão respondidas por ofício após a reunião.

TESTE DE MICRONÚCLEO



Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

IMPORTÂNCIA

- **As substâncias químicas que são capazes de induzir mutações apresentam o potencial de causar danos às células germinativas levando a problemas de fertilidade e a mutações, que poderão ser passadas às gerações futuras.**
- **As substâncias químicas mutagênicas também são capazes de induzir câncer.**
- **As mutações podem ser pontuais (nos genes), onde apenas um único ou poucos pares de bases são modificados, inseridos ou excluídos, como também podem ocorrer grandes exclusões ou reorganizações no material genético, como quebras e outras alterações nos cromossomos.**

OFÍCIO CIRCULAR 002/09/GGTOX

- Dose abaixo da dose letal ou daquelas que produzem alguma indicação de toxicidade na medula óssea.
- Outro ponto crítico: seleção de sexo e número de animais.

CONSIDERAÇÃO INICIAL

- Num experimento onde o órgão-alvo é a medula óssea, há a necessidade de se comprovar que a substância teste foi capaz de penetrar no osso e atingir a medula.

- Limitação: Dose incapaz de atingir a medula óssea e capaz de causar morte. Quando isso ocorrer, o laboratório e a empresa deverão escolher outro método.

SELEÇÃO DE NÚMERO E SEXO

➤ Seguir os protocolos:

- No mínimo 5 animais por sexo e por dose.
- Para se testar um único sexo:
 - ❖ Protocolos OECD 474 e OPPTS 870.5385 – Se, no momento do estudo, houver dados disponíveis e **CONSISTENTES** (do produto formulado), na mesma espécie e na mesma rota de exposição que demonstrar que **NÃO HÁ DIFERENÇAS** entre os sexos quanto a toxicidade (do produto formulado), pode-se testar um único sexo no teste definitivo.
 - ❖ Protocolo do Japão – Os estudos podem ser conduzidos apenas com machos se **NÃO HOUVER CLARA DIFERENÇA** entre os sexos quanto a toxicidade (do produto formulado).

SELEÇÃO DE DOSE

➤ Considerações:

- Para **PRODUTO FORMULADO**: para a escolha das doses de produtos formulados, os dados de literatura geralmente disponíveis não podem ser utilizados, pois dizem respeito apenas ao **INGREDIENTE ATIVO** e o que precisamos avaliar é a resposta gerada pelo conjunto de componentes da formulação.
- Seguir os **Protocolos internacionalmente reconhecidos** e o **Documento Nº 01/2004 da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)**.

SELEÇÃO DE DOSE

- 1º DOSE MÁXIMA TOLERADA (DMT) – TESTE PRELIMINAR:

- ❖ A DMT é a dose mais alta que pode ser administrada, sem induzir mortalidade, ou aquela que produza depressão da medula óssea.
- ❖ **Identificação da DMT:** estudo piloto com 2 ou 3 animais/sexo/dose, focando os sinais clínicos de toxicidade para o animal ou para a medula óssea.
- ❖ Embora a dose mais alta a ser testada deva ser a DMT, ela não deve exceder 2000 mg/Kg. Devem ser testadas 3 doses, cobrindo uma extensão que vai da DMT até aquela que induza pouca ou nenhuma toxicidade. Geralmente, as doses mais baixas devem ser 50% e 25% da DMT.
- ❖ Na ausência de mortalidade ou toxicidade e se a mutagenicidade não é esperada, pode-se testar uma única dose de **2000 mg/Kg/dia**.

SELEÇÃO DE DOSE

- 2º DOSE LETAL 50% (DL50) – TESTE PRELIMINAR:
 - ❖ Outro método para a seleção das doses no teste preliminar a serem testadas no teste definitivo, pode-se utilizar a Dose Letal 50% (DL50) do produto formulado (pela mesma via a ser utilizada no teste final). Neste caso, a maior dose deve ser 80% da DL50 e as menores serão 50% e 25% da DL50.

TESTE DE AMES



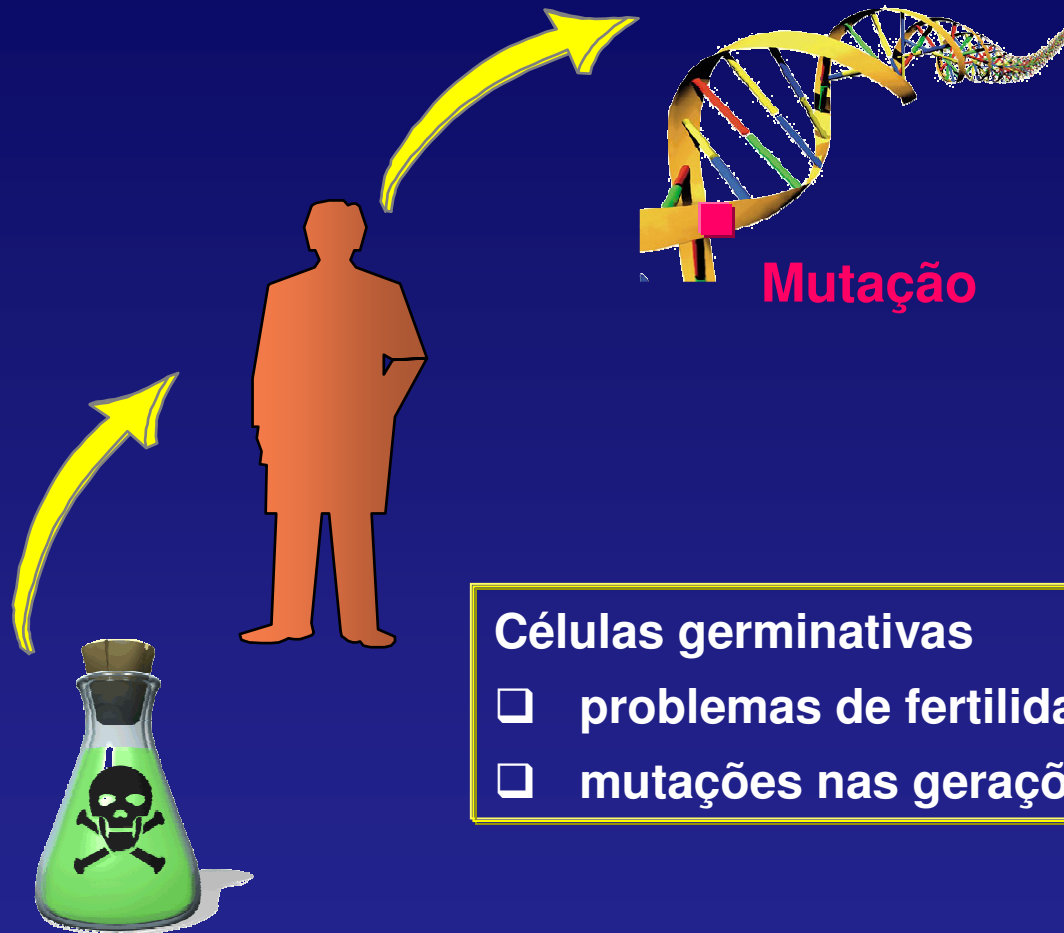
Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

Por que avaliar o potencial mutagênico das substâncias?



Por que avaliar o potencial mutagênico das substâncias?

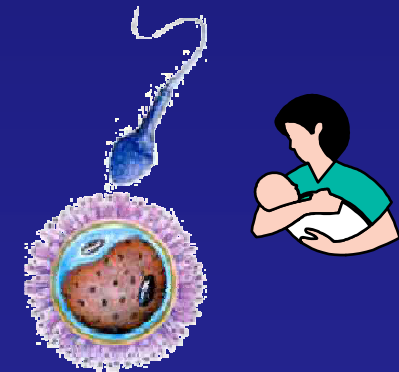


Células somáticas

- câncer
- anemias
- envelhecimento

Células germinativas

- problemas de fertilidade
- mutações nas gerações futuras



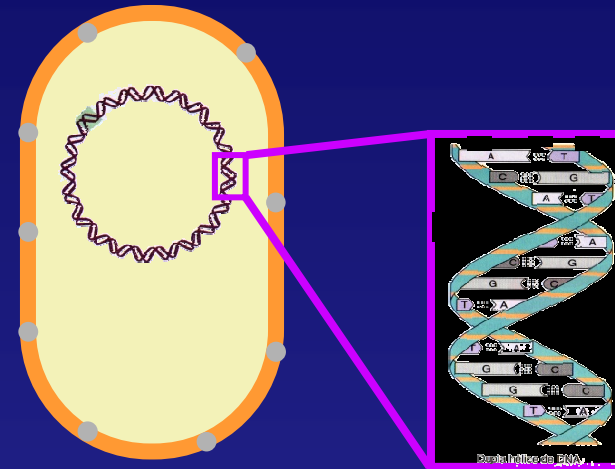
Teste de Ames

- ❑ Teste *in vitro* de “screening” para identificar substâncias capazes de induzir mutações gênicas
- ❑ Vantagens: rápido, barato, relativamente fácil de realizar



Sistema biológico: bactérias

- ❑ *Salmonella typhimurium*
- ❑ *Escherichia coli*



Ensaio de
mutação reversa



S. typhimurium

his -



his +

Escherichia coli

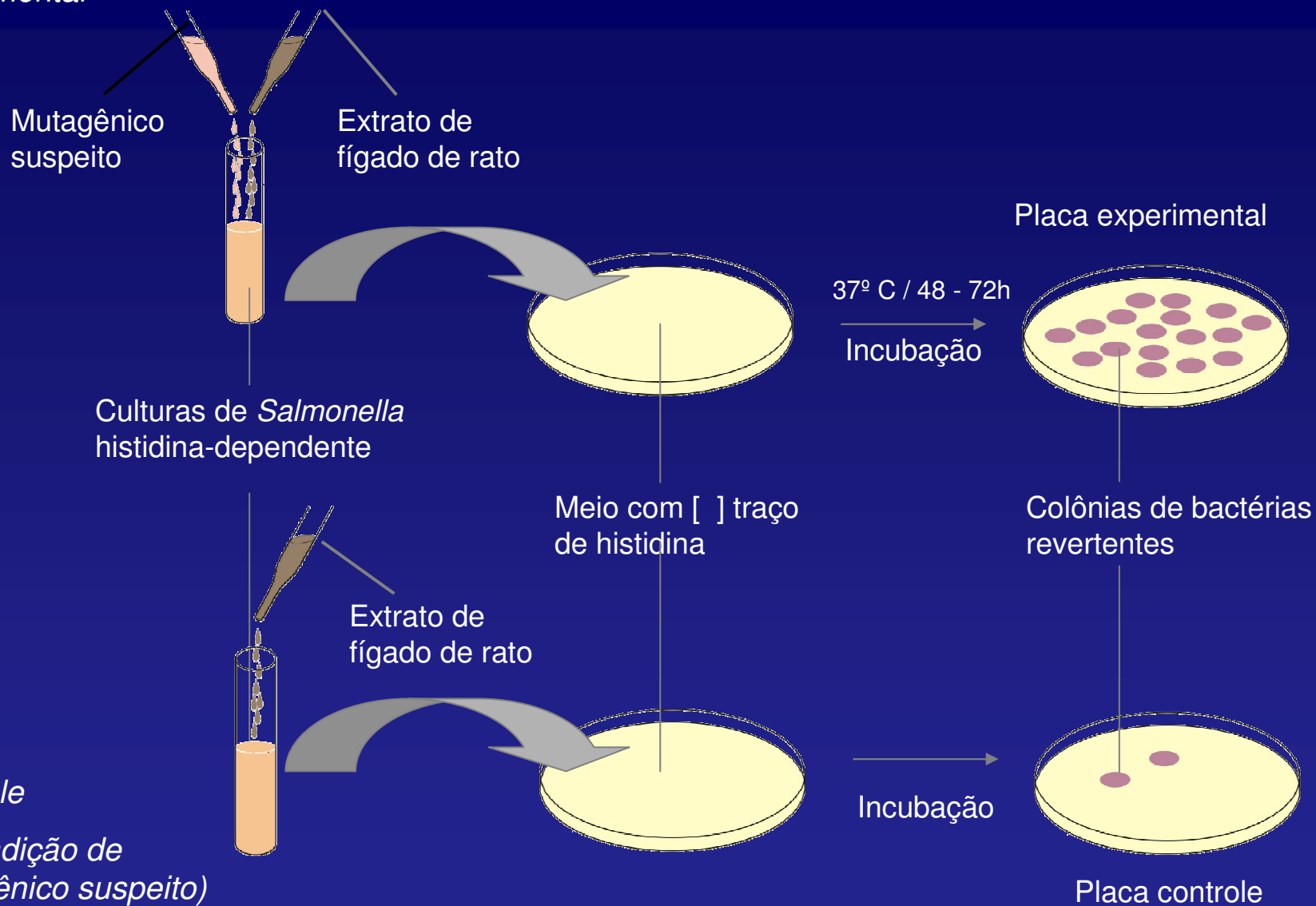
trip -

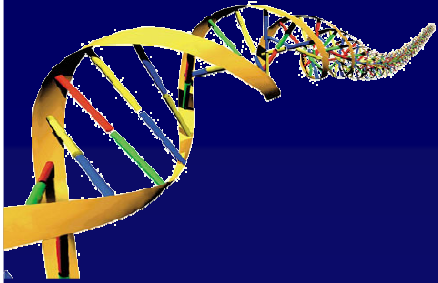


trip +

Amostra experimental

Teste de mutação reversa em bactérias





Teste de Ames

Problema 1

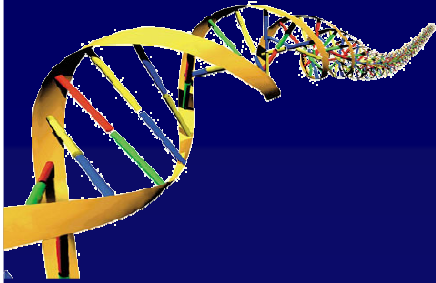


Teste realizado com menos de cinco cepas

Protocolo OECD 471 (1997) “Orientações da SBMCTA”



Item 13 - O teste deve ser realizado com pelo menos cinco cepas, que devem ser combinadas de forma que todos os tipos prováveis de mutações possam ser detectados



**Justificativas dos
laboratórios/empresas**

Não houve contestação

Posicionamento da ANVISA

**Será aceita complementação
com a cepa faltante, desde que
o teste com as demais cepas
tenha sido bem conduzido**



Problema 2



Doses citotóxicas que **eliminam todas as colônias** e não apenas diminuem o crescimento de fundo, nº de revertentes ou sobrevivência celular ⇒ **menos de cinco concentrações analisáveis**

Protocolo OECD 471 (1997) “Orientações da SBMCTA”



Item 19 - A citotoxicidade pode ser verificada pela observação visual da alteração do crescimento de fundo (“background”), pela redução do número de colônias revertentes por placa em relação ao controle negativo ou, ainda, pelo decréscimo de sobrevivência celular das culturas tratadas

Item 20 – Pelo menos 5 concentrações analisáveis devem ser usadas





Teste de Ames - Problema 2

Justificativas dos laboratórios/empresas

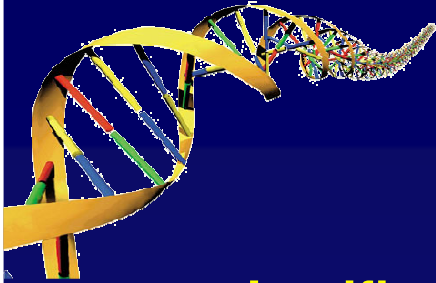
- ❑ Teste preliminar com uma cepa (TA100) ⇒ citotoxicidade em uma ou mais cepas no teste definitivo
- ❑ Mortelmans e Zeiger (2000): a dose mais alta do estudo deve apresentar efeito citotóxico para demonstrar que a faixa do estudo está no limite máximo

Posicionamento da ANVISA

- ❑ Se houver citotoxicidade (com eliminação de todas as colônias) em uma dose no teste definitivo ⇒ refazer o teste com a cepa, abaixando as concentrações até a concentração citotóxica aceitável (critérios dos protocolos internacionais)

* Mortelmans e Zeiger (2000): ausência completa do crescimento de fundo (“background”) indica alta toxicidade. Tal dose tóxica não deve ser usada





Justificativas dos laboratórios/empresas

- Aplicação de modelos estatísticos quando uma concentração é eliminada

Posicionamento da ANVISA

- Não será aceita modelagem estatística para ajustar a falta de uma dose – Protocolos preconizam 5 doses analisáveis



Problema 3



- ❑ Não verifica a eficácia da fração S-9 com outro mutágeno, além do 2-AA*
- ❑ Não apresenta o certificado de análise do fabricante

* 2-AA pode ser ativado por outras enzimas além das microssomais. Fonte: Mortelmans e Zeiger (2000)

⇒ Influência na confiabilidade do resultado final do estudo, caso a fração S-9 não esteja funcionando adequadamente, e apenas o 2-AA seja utilizado

Protocolo OECD 471 (1997)



Item 23 - O 2-aminoantraceno **não** deve ser usado como **único** indicador da eficácia da fração S-9. Neste caso, cada batelada de S-9 deve ser **também** caracterizada com um **mutágeno** que requer **ativação** **metabólica** por **enzimas microssomais**





Justificativas dos laboratórios/empresas

Afirma que os estudos que usaram apenas 2-AA são válidos, uma vez que o reagente S-9 é controlado pelo fabricante. No entanto, reconhece que o certificado de qualidade do lote (com a caracterização com outro mutágeno) deve ser anexado ao estudo

Posicionamento da ANVISA

Se a fração S-9 for comprada pelo laboratório, será aceito certificado de análise do fabricante para cada lote

Se for produzida pelo laboratório, este deve testar a fração S-9 com outra substância mutagênica e apresentar os resultados



IRRITAÇÃO OCULAR



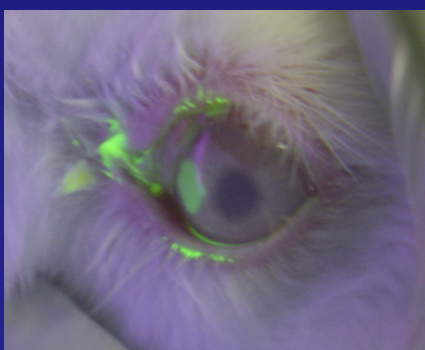
Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

Teste de Irritação Ocular

Importância do estudo:

Dados em animais

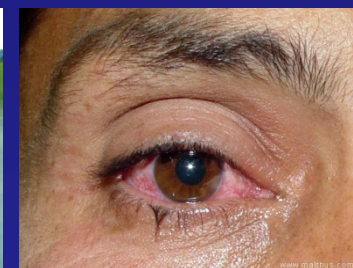


Exposição humana

- Ocupacional
- Acidental

Recomendação de EPIs

Frases de Alerta ao usuário



Teste de Irritação Ocular

Problemas:



- ❑ Lavagem do olho tratado logo após a aplicação
- ❑ Diluição da substância sólida

Protocolo OECD 405 (2002):



- ❑ Item 12 – Os olhos **não** devem ser **lavados** por pelo menos **24 h** após instilação da substância, exceto para os sólidos
- ❑ Item 15 - O material deve ser moído até obter um pó fino. O volume do material **sólido** deve ser medido após compactá-lo gentilmente no recipiente.
- ❑ Se a substância sólida não tiver sido removida do olho por mecanismos fisiológicos até 1 h após o tratamento, o olho pode ser lavado.



Justificativas dos laboratórios/empresas

- Não houve contestação
- Afirma que o critério para classificação toxicológica está em desacordo com o aplicado internacionalmente

Posicionamento da ANVISA

- Refazer o teste de acordo com o protocolo
- Não existe harmonização Internacional
- Portaria 3/1992 está em revisão, mas os países tem soberania para regular quanto aos critérios de classificação

SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

Teste de Sensibilização Cutânea

Importância do teste: detectar se uma determinada substância apresenta potencial de sensibilização, o que se caracteriza por uma reação imunológica geralmente exacerbada.



Teste de Sensibilização Cutânea



Problema: Teste realizado com doses/concentrações que não causam nenhum grau de irritação dérmica, quando a substância testada é irritante.



Teste de Sensibilização Cutânea



Protocolo OECD 406 (1992)

Teste de Maximização (Item 14) e Teste de Buehler (Item 27):

" a concentração da substância teste usada para cada exposição de indução deve ser tolerada sistemicamente e deve ser a mais alta dose que cause de leve à moderada irritação"

" a concentração usada para o desafio deve ser a mais alta dose não irritante"

" as concentrações apropriadas podem ser determinadas em um estudo piloto usando dois ou três animais"



Teste de Sensibilização Cutânea

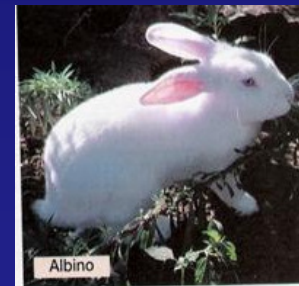


Teste de Sensibilização X Teste de Irritação Dérmica

“Está claro que uma substância irritante pode não ser sensibilizante, já que o *endpoint* dos testes é diferente, embora as lesões sejam iguais”



≠



Produto Formulado ≠ Produto Técnico

Teste de Sensibilização Cutânea



Endpoint: resposta imunológica específica

Período de Indução: 1º contato com a substância “desconhecida” (antígeno) → indução/formação da resposta imunológica

Desafio: novo contato com a mesma substância

Memória Imunológica → Hipersensibilidade



Teste de Sensibilização Cutânea



Estudo piloto para escolha das concentrações:

Exemplo 1:

Concentrações testadas: 25%, 50%, 75% e 100%

Resultados: irritante apenas a 100% (substância pura/sem diluição)

Concentração escolhida: 50% para indução e desafio

Concentrações adequadas: 100% para indução e 75% para desafio

Teste de Sensibilização Cutânea



Estudo piloto para escolha das concentrações:

Exemplo 2:

Concentrações testadas: 25%, 50%, 75% e 100%

Resultados: não irritante

Concentração escolhida: 75% para indução e 100% para desafio

Concentrações adequadas: 100% para indução e 100% para desafio

Teste de Sensibilização Cutânea



Área de aplicação da substância teste:

“aumentar a dose de exposição até o ponto onde uma reação dérmica é gerada é impraticável nos casos em que uma área de 6cm² não suporta esta quantidade”

1 mL substância teste pura = 100%

0,75 mL substância teste pura + 0,25 mL solvente/veículo = 75%

0,5 mL substância teste + 0,5 mL solvente/veículo = 50%

0,25 mL substância teste + 0,75 mL solvente/veículo = 25%

Discussão dos resultados e conclusão

Problema: Ausência de discussão dos resultados e conclusão do estudo.

Protocolos:

DL50 Oral (401) e DL50 Dérmica (402) → Interpretação dos Resultados

CL50 Inalatória (403) → Interpretação dos Resultados

Irritação Dérmica (404) → Discussão dos Resultados

Irritação Ocular (405) → Discussão dos Resultados

Sensibilização (406) → Discussão dos Resultados

Mutação Reversa em Bactérias (471) → Discussão dos Resultados e Conclusão

Teste de Micronúcleo → Discussão dos Resultados e Conclusão



Obrigada!

Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Toxicologia

toxicologia@anvisa.gov.br

3462 6507

3462 6508



Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br