



ANVISA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**GUIA PARA A CONDUÇÃO DE
ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE
TOXICOLOGIA E SEGURANÇA
FARMACOLÓGICA
NECESSÁRIOS AO
DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS**

**Gerência de Avaliação de Segurança e
Eficácia – GESEF**

Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2

Copyright © 2013. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.
Depósito Legal na Biblioteca Nacional, conforme Decreto n.º 1.825, de 20 de dezembro de 1907.

Diretor-Presidente

Dirceu Brás Aparecido Barbano

Adjunto de Diretor-Presidente

Luiz Roberto Klassmann

Diretores

Dirceu Brás Aparecido Barbano

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Chefe de Gabinete

Vera Bacelar

Gerência Geral de Medicamentos

Antônio César Silva Mallet

Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia

Laura Gomes Castanheira

Participação direta:

Coordenação de Pesquisas, Ensaios Clínicos e Medicamentos Novos - COPEM

Sumário

<i>Lista de abreviaturas.....</i>	<i>4</i>
<i>1. Introdução.....</i>	<i>5</i>
<i>2. Estudos de toxicidade de dose única (aguda).....</i>	<i>6</i>
<i>3. Estudos de toxicidade de doses repetidas.....</i>	<i>7</i>
<i>4. Estudos de toxicidade reprodutiva</i>	<i>9</i>
<i>5. Estudos de genotoxicidade.....</i>	<i>14</i>
<i>6. Estudos de tolerância local.....</i>	<i>16</i>
<i>7. Estudos de carcinogenicidade.....</i>	<i>22</i>
<i>8. Estudos de interesse para a avaliação da segurança farmacológica.....</i>	<i>26</i>
<i>9. Estudos de toxicocinética.....</i>	<i>31</i>
<i>10. Estudos não clínicos de segurança para o desenvolvimento e registro de ADF (Associação em Dose Fixa) de medicamentos sintéticos e semi-sintéticos de uso oral...35</i>	
<i>11. Referências.....</i>	<i>41</i>

Lista de Abreviaturas

ADME	<i>Absorção, distribuição, metabolismo e excreção</i>
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
AUC	<i>Área sob a curva de concentração versus tempo</i>
BPL	<i>Boas Práticas de Laboratório</i>
DL50	<i>Dose Letal 50%</i>
EMA	<i>European Medicines Agency (Agência Europeia de Regulação de Medicamentos)</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration (Agência de Regulação de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América)</i>
GLP	<i>Good Laboratory Practice (Boas Práticas de Laboratório)</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Conferência Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Fármacos de Uso Humano)</i>
LOAEL	<i>Menor nível de dose com observação de efeito adverso</i>
LOEL	<i>Menor nível de dose com observação de efeito</i>
MTD	<i>Dose Máxima Tolerada</i>
NCI	<i>National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)</i>
NOAEL	<i>Nível de dose sem observação de efeito adverso</i>
NOEL	<i>Nível de dose sem observação de efeito</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development (Organização para Cooperação e Desenvolvimento da Economia)</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free (Livre de Patógenos Específicos)</i>
WHO	<i>World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)</i>

1. Introdução

O presente Guia é uma orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. Porém, caso o pesquisador/instituição consiga comprovar a segurança desses fármacos por outros estudos científica e tecnicamente mais viáveis, os dados apresentados poderão ser avaliados pela ANVISA. O uso de métodos alternativos *in vitro* em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente são recomendados.

A sua elaboração foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMA), e de instituições de interesse na área (ICH, OECD, NCI, WHO), visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional. Além disso, o guia também tem a intenção de racionalizar estudos não clínicos, evitando duplicidades e utilização desnecessária de animais sem que isso possa comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da substância a ser testada.

Os estudos não clínicos de segurança propostos nesse documento incluem: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME). Outros estudos que avaliam a segurança da substância teste poderão ser necessários conforme o caso.

Os estudos propostos devem ser conduzidos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) - OECD Principles of Good Laboratory Practice; HANDBOOK: GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP) WHO (Quality practices for regulated non-clinical research and development), quando aplicável, e os animais a serem utilizados deverão ser saudáveis, preferencialmente livres de patógenos (SPF – Specific Pathogen Free), e de origem conhecida, além de possuir peso e idade adequados ao experimento. Em caso de fármacos com novo mecanismo de ação, recomendamos que seja previamente avaliado se a espécie animal indicada para a realização dos estudos de segurança é considerada a mais apropriada para a extrapolação de dados para humanos. Para novos excipientes devem ser conduzidos estudos não clínicos de segurança, caso não haja informações sobre sua toxicidade.

Ressaltamos que o desvio das orientações do guia deverá sempre ser justificado.

A partir do guia pretende-se que os estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de novos medicamentos sejam realizados de forma harmonizada e

cientificamente válida. Além disso, espera-se que eles possam fornecer dados confiáveis para dar subsídios às futuras Pesquisas Clínicas.

2. Estudos de Toxicidade de Dose Única (Aguda)

Definição/Objetivo:

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração.

Modelo animal a ser estudado:

Devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos.

Via de administração:

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.

Dosagem:

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.

Período de Observação:

Período de observação dos animais: no mínimo 14 dias após a administração da substância teste. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes. Posteriormente, no mínimo uma vez ao dia.

Observações:

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*.

3. Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas

Definição/Objetivo:

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do NOEL e NOAEL.

Modelo animal a ser estudado:

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.

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.

Dosagem:

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

descendente sugerindo-se intervalos de 2 a 4 vezes.

Período de Observação

Duração Mínima dos estudos de Toxicidade de Doses Repetidas: Vide quadro abaixo*.

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

*ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2)-junho/2009.

Parâmetros a serem avaliados:

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 anátomo 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 anátomo e histopatológicas.

Observações:

Os dados de segurança obtidos nesses estudos dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica. As condições ambientais devem ser as preconizadas para a espécie estudada. Deve-se monitorar a qualidade e composição da dieta e água durante todo o

período do estudo e recomenda-se registrá-las no relatório. Para avaliação do potencial de toxicidade de doses repetidas podem ser utilizados os guias da *OECD*.

4. Estudos de Toxicidade Reprodutiva

Definição/Objetivo:

O objetivo dos estudos de toxicidade reprodutiva é revelar algum efeito de uma ou mais substâncias ativas na reprodução de mamíferos. Para este propósito, investigações e interpretações dos resultados devem ser relacionadas com outros dados farmacológicos e toxicológicos disponíveis, para determinar situações em que riscos potenciais para a reprodução humana são maiores, menores ou iguais àqueles relativos a outras manifestações toxicológicas.

Estudos a serem realizados:

Os estudos de toxicidade reprodutiva devem contemplar principalmente avaliações nas seguintes fases:

- A. Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial,
- B. Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna,
- C. Desenvolvimento embrio-fetal.

Existe 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 embrio-fetal. Porém, devem-se realizar os estudos de embriotoxicidade também em uma espécie não roedora.

Para avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva podem ser utilizados os guias da *OECD*.

A -Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial

A.1. Modelo animal a ser estudado:

No mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos. A proporção adequada de machos e fêmeas é de 1:1.

A.2. Via de Administração:

A mesma pretendida para uso humano.

A.3. Dosagem:

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.

A.4. Período de Observação:

Fêmea: Período fértil, implantação e desenvolvimento dos estágios embrionários de pré-implantação. 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.

A.5. Parâmetros a serem avaliados:

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

Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, alteração 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 órgãos com alterações macroscópicas e órgãos controle para posterior avaliação; preservar testículos, epidídimo, ovários e útero de todos os animais para possível avaliação histológica; contagem e viabilidade de esperma em epidídimo ou testículo; contagem de corpos lúteos e implantações; fetos vivos e mortos.

B -Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna:

B.1. Modelo animal a ser estudado:

No mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos.

B.2. Via de Administração:

A mesma pretendida para uso humano. Fêmeas devem ser expostas à substância teste desde a implantação até o final da lactação.

B.3. Dosagem:

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 determinada 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.

B.4. Período de Observação:

Período de prenhez e lactação das fêmeas avaliadas.

B.5. Parâmetros a serem avaliados:

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.

B.6. Observações:

Um macho e uma fêmea por ninhada devem ser selecionados para acasalamento na

idade adulta com objetivo de avaliar a sua competência reprodutiva.

C -Desenvolvimento embrio-fetal:

C.1. Modelo animal a ser estudado:

Usualmente duas espécies: uma roedora, preferencialmente ratos, e uma não roedora, preferencialmente coelhos. O uso de outras espécies deverá ser justificado.

C.2. Via de Administração:

A mesma pretendida para uso humano.

C.3. Dosagem:

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 determinada 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.

C.4. Período de Observação:

Fêmeas devem ser submetidas à eutanásia e examinadas um dia antes da parição. Todos os fetos devem ser identificados individualmente e examinados quanto à viabilidade e anormalidades no dia da eutanásia.

C.5. 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).

C.6. Observações:

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

Lactação: Em casos de avaliação de riscos para lactentes (cujas mães foram expostas à substância teste 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 dos filhotes lactentes, características físico-químicas e farmacocinéticas da substância, quantidade absorvida estimada e permanência da substância no leite.

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:

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.

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.

5. Estudos de Genotoxicidade

Definição/Objetivo:

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas.

Estudos a serem realizados:

Opção 1: Bateria de testes:

- 1- Um teste para mutação gênica em bactéria,
- 2- Um teste citogenético para avaliação de dano cromossômico (teste de aberrações cromossômicas *in vitro* ou teste de micronúcleo *in vitro*) ou um teste *in vitro* de mutação gênica em células tk de linfoma de camundongo,
- 3- Um teste *in vivo* para genotoxicidade, geralmente um teste de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores, podendo ser micronúcleos ou aberrações cromossômicas.

Opção 2: Bateria de testes:

- 1- Um teste para mutação gênica em bactéria,
- 2- Uma avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo em células hematopoiéticas de roedores e um segundo ensaio *in vivo*.

Modelos Biológicos a serem Estudados:

Para o teste de mutação gênica recomenda-se a utilização de linhagens de *Salmonella*

typhimurium para detectar mudanças nos sítios de Guanina-Citosina (G-C) como TA1535, TA1537 (ou TA 97, ou TA97a), TA98 e TA100. Para a detecção de pontos de mutação nos sítios de Adenina-Timina (A-T) deve-se utilizar *Salmonella typhimurium* TA 102, *Escherichia coli* WP2 uvrA ou *Escherichia coli* WP2 uvrA (pKM101).

Os testes de aberrações cromossômicas em células hematopoiéticas de roedores podem detectar um amplo espectro de mudanças na integridade cromossômica.

Os ensaios *in vitro* devem ser realizados sempre em duas condições: na presença e na ausência de ativação metabólica.

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.

Via de Administração (quando aplicável):

Similares àquelas preconizadas para uso humano.

Dosagem (quando aplicável):

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.

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.

Para testes *in vivo*:

Protocolos de curta duração: (geralmente 1-2 administrações): a máxima dose recomendada é uma dose limite de 2000 mg / kg se esta é tolerada, ou a máxima dose em que níveis mais altos seria esperado para a produção de letalidade. Doses mais baixas são geralmente espaçadas em aproximadamente dois a três intervalos de vezes inferiores a essa dose.

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.

Parâmetros a serem 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.

Os testes de genotoxicidade devem ser capazes de avaliar os potenciais danos ao DNA que podem ser observados na forma de mutações gênicas e alterações cromossômicas, que podem ser numéricas ou estruturais. Estas podem estar fortemente relacionadas à produção de alterações hereditárias e em diferentes etapas do desenvolvimento de malignidades.

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.

Observações:

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

Para avaliação do potencial de genotoxicidade podem ser utilizados os guias da *OECD*.

6. Estudos de Tolerância Local

Definição/Objetivos:

A avaliação de tolerância local deve ser realizada em testes de laboratório antes da exposição humana ao produto. O objetivo destes estudos é saber se as substâncias

(princípios ativos e excipientes) são toleradas em locais do corpo que poderão entrar em contato com o produto em consequência da sua administração na prática clínica. 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.

É preferível avaliar a tolerância local pela via terapêutica pretendida como parte dos estudos de toxicidade geral; estudos autônomos geralmente não são recomendados.

Modelo animal a ser utilizado:

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.

Dosagem:

Regra geral, a real concentração de substância ativa utilizada em seres humanos deve ser testada. A dose pode, então, ser ajustada através da variação da frequência de administração.

Administração:

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.

Via de Administração:

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.

Reversibilidade:

Avaliações de reversibilidade das lesões locais deverão ser incluídas quando relevantes.

Bem-estar animal:

Em caso de forte irritabilidade em testes com modelos menos sensíveis, o progresso a modelos mais sensíveis deve ser cuidadosamente considerado. Cuidados também devem ser tomados para minimizar a exposição dos animais a irritações dolorosas, encerrando os experimentos no momento apropriado, ou seja, no ponto onde são vistas reações adversas graves e não esperar a continuação para fornecer resultados essenciais para a avaliação dos riscos.

Estudos Realizados:

- A. Testes de Tolerância no Local de Administração
- B. Teste de Toxicidade Sistêmica
- C. Testes de Tolerância para Vias Específicas de Administração
- D. Potencial de Sensibilidade

A. Testes de Tolerância no Local de Administração

Os testes de Tolerância Local devem ser realizados nos locais que entrarão em contato com a substância como resultado do método de administração 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 o local de administração afastados do alvo terapêutico (Por exemplo, sistemas transdérmicos, medicamentos administrados por via endovenosa). No planejamento de ensaios de tolerância local, as seguintes informações devem consideradas:

As propriedades físico-químicas do produto. Por exemplo, para evitar sofrimentos desnecessários, produtos que são corrosivos pelo seu pH devem ser excluídos de estudos em animais vivos.

A farmacodinâmica, dados toxicológicos e farmacocinéticos para a substância ativa, ou a combinação de substâncias ativa, bem como dos excipientes. Avaliação global 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.

O teste de tolerância local pode ser parte de outros estudos sobre toxicidade desde que o medicamento seja administrado sob condições adequadas.

B. Teste de Toxicidade Sistêmica

Nos casos em que o medicamento não foi testado anteriormente, estudos de avaliação de toxicidade deverão ser conduzidos. Estes estudos devem empregar uma via de administração adequada, que resulta na exposição sistêmica. O ensaio deve incluir as 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:

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.

C. Testes de Tolerância para Vias Específicas de Administração

Via dérmica:

Modelo animal a ser utilizado:

A seleção das espécies deve ser justificada, geralmente são utilizados coelhos.

Parâmetros a serem Avaliados:

Em relação aos testes de tolerância dérmica, devem ser considerados, no mínimo: testes de dose única, doses repetidas e avaliação do potencial de sensibilidade.

-Para testes de dose única: 1-Testes relacionados à corrosão da pele poderão ser realizados *in vitro*. 2-Testes de irritação poderão ser realizados em coelhos. A pele é examinada para avaliar 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 depois da administração. Caso as mudanças persistam, poderão ser necessárias observações por período maior que oito dias após a administração.

-Para testes de doses repetidas: 1-Deverão ser conduzidos em coelhos (outras espécies animais podem ser utilizadas se adequadamente validadas). 2-A pele deverá ser avaliada durante o mesmo período citado para os testes de dose única. 3-Exames histológicos devem ser considerados caso a caso.

-Potencial de Sensibilidade: Sistemas de testes recomendados: Ensaio em cobaia, Ensaio de Linfonodo Local.

Via Parenteral:

Modelo animal a ser utilizado:

A seleção das espécies deve ser justificada.

Parâmetros a serem Avaliados:

-Frequência de administração: Única. Em alguns casos, administrações repetidas (sete dias) podem ser importantes.

-Para única administração, observações repetidas dos animais e dos sítios de injeção devem ser realizadas durante 48-96 horas depois da administração. Depois disso, um cuidadoso exame macroscópico dos sítios de injeção e tecidos circundantes deve ser realizado. Caso seja necessário para diagnóstico, um exame histológico poderá ser também realizado.

-Para administrações repetidas, observações dos sítios de injeção e de animais devem ser realizadas. Depois da última administração, os procedimentos devem ser os mesmos recomendados para administração única.

Via ocular:

Modelo animal a ser utilizado:

A seleção das espécies deve ser justificada, geralmente são utilizados coelhos.

Parâmetros a serem Avaliados:

O tipo de ensaio de tolerância ocular será determinado pela magnitude da exposição ao produto (por exemplo, produtos que se destinem a ser administrados repetidamente no olho, obviamente requerem estudos mais extensos do que produtos sujeitos a exposição acidental). A avaliação da tolerância para os medicamentos destinados a administração ocular exige: Um teste de tolerância ocular de dose única (normalmente realizado em coelhos). Neste teste, um olho serve como alvo de tratamento e 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 por, pelo menos, 72 horas após a administração. O investigador deve concluir o teste com uma avaliação adequada das reações observadas. O tipo e extensão das investigações realizadas devem ser feitas de forma individual caso a caso.

Um teste de tolerância ocular dose repetida (normalmente realizado em coelhos com administração diária durante quatro semanas). O desenho deste teste deve considerar os resultados da tolerância ocular dose única. O exame histológico deverá ser considerado caso a caso.

Em ambos os experimentos, avaliações de diferentes tecidos em contato com o produto, bem como o corpo vítreo e do fundo ocular devem ser incluídos. A avaliação da tolerância ocular também é necessária para os produtos que não se destinam a serem

administrados aos olhos, mas que se possa razoavelmente esperar que resultem em exposição no decurso da sua utilização clínica normal (por exemplo, loções ou gel utilizados para o tratamento da pele da face, xampu medicinal, etc.). Nestes casos, um teste de tolerância ocular usando uma única administração deverá ser executado.

Via Retal:

Modelo animal a ser utilizado:

A seleção das espécies deve ser justificada, geralmente são utilizados coelhos ou cães.

Dosagem:

O volume de aplicação é baseado na dose terapêutica humana da formulação galênica ou no volume máximo aplicável à espécie animal.

Administração:

Normalmente uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias, de acordo com a utilização clínica.

Parâmetros a serem Avaliados:

Observação da região anal e esfíncter anal, os sinais clínicos (por exemplo, sinais de dor) e fezes (por exemplo, sangue, muco). Eutanásia dos animais após a administração, necropsia e exame macroscópico da mucosa retal. Realização de exame histológico para diagnóstico, se necessário. Como nos medicamentos administrados sobre a pele, potencial de sensibilidade deve ser avaliado por meio de testes validados, geralmente realizados em cobaias.

Via Vaginal:

Modelo animal a ser utilizado:

A seleção das espécies deve ser justificada, geralmente são utilizados coelhos, cães ou ratos.

Dosagem:

O volume de aplicação é baseado na dose terapêutica humana da formulação galênica ou no volume máximo aplicável à espécie animal.

Administração:

Normalmente uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 7 dias, de acordo com a utilização clínica.

Parâmetros a serem Avaliados:

Observação da região vaginal, sinais clínicos (por exemplo, sinais de dor) e secreção vaginal (por exemplo, sangue, muco). Se os animais forem submetidos à eutanásia após

administração, realizar necropsia e exame macroscópico da mucosa vaginal e do sistema reprodutor. Realização de exame histológico para diagnóstico. Investigações adicionais (isto é, efeitos no muco cervical, ação espermicida) deverão ser consideradas caso a caso. Como nos medicamentos administrados sobre a pele, potencial de sensibilidade deve ser avaliado por meio de testes validados, geralmente realizados em cobaias.

D. Potencial de Sensibilidade

Sistemas de testes recomendados:

Ensaio em cobaia: de acordo com o guia OECD para testes químicos nº406.

Ensaio de Linfonodo Local: descrito na publicação: “*The Murine Local Lymph node assay*:

A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds” (NIH Publication N°: 99-4494).

Observações:

A avaliação da Tolerância Local deve ser realizada antes de se iniciar a Fase 1 da Pesquisa Clínica e poderá ser parte de outros estudos de toxicidade.

7. Estudos de Carcinogenicidade

Definição/Objetivo:

Identificar substâncias que possam causar o desenvolvimento potencial de tumores em algum local por algum mecanismo, observando testes animais para o desenvolvimento de lesões como consequência da exposição, durante um tempo considerável de sua vida, por várias doses da substância teste e por uma via de administração apropriada.

Estudos a serem realizados:

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.

Modelo animal a ser estudado:

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.

Via de Administração:

Os estudos devem ser conduzidos com administração pela mesma via de administração pretendida na clínica, quando possível. 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.

Dosagem:

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.

Período de Observação:

Para os estudos de longo prazo: 24 meses em ratos e, no mínimo, 18 meses em

camundongos e hamsters.

Parâmetros a serem avaliados:

Os parâmetros deverão ser avaliados conforme orientação do Guia OECD 451.

Todos os animais devem ser avaliados para morbidade ou mortalidade, geralmente no início e final de cada dia. Atenção especial deve ser dada ao desenvolvimento de tumores: o início, localização, dimensões, aparência, progressão de cada tumor macroscopicamente visível ou palpável. Devem ser verificados periodicamente sinais específicos de importância toxicológica além de peso corporal e consumo de ração/água.

Hematologia: Esfregaços sanguíneos são realizados a critério do patologista.

Necropsia: Os animais deverão ser submetidos à necropsia completa e detalhada, que inclui: um exame cuidadoso da superfície externa do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica, abdominal e seus conteúdos. O peso dos órgãos não é normalmente parte de um estudo de carcinogênese.

Os seguintes tecidos devem ser preservados em meio de fixação mais adequado para o tipo de tecido avaliado bem como para o exame histopatológico: 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 tireóide, traquéia, 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. Além disso, órgãos-alvo com base nas propriedades conhecidas da substância teste devem ser avaliados.

Observações:

Necessidade da Realização de Ensaio de Carcinogenicidade

- Casos de eventual necessidade de avaliação de potencial carcinogênico:

(1) Estudos de carcinogenicidade devem ser realizados para quaisquer fármacos pretendidos para uso clínico contínuo de pelo menos 6 meses. Espera-se que muitos

fármacos indicados para tratamento inferiores a 6 meses sejam utilizados de maneira contínua e intermitente. Em tais casos, como por exemplo, em terapias para rinite, depressão e ansiedade, há uma preocupação quanto ao potencial carcinogênico de tais fármacos.

(2) Produtos da mesma classe de um fármaco cujo potencial carcinogênico foi demonstrado anteriormente.

(3) Relação estrutura-atividade sugerindo potencial carcinogênico.

(4) Evidência de lesões pré-neoplásicas em estudos de toxicidade em doses repetidas.

(5) Retenção do composto ou seus metabólitos nos tecidos resultando em reações locais ou outras alterações patofisiológicas.

(6) Quando houver preocupação com o potencial fotocarcinogênico, ensaios com aplicação dérmica (geralmente em camundongos) podem ser necessários.

Casos onde ensaios de carcinogenicidade podem não ser necessários:

(1) Quando a expectativa de vida da população-alvo for curta (menor que 2 a 3 anos).

(2) Substâncias utilizadas topicamente (ex. via dérmica ou ocular) podem necessitar de ensaios de carcinogenicidade. 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.

(3) Compostos comprovadamente genotóxicos, na ausência de outros dados, são presumidamente carcinógenos a seres humanos e não necessitam de estudos de longo prazo de carcinogenicidade. Entretanto, se o uso pretendido de tal fármaco for para terapias crônicas, um ensaio de toxicidade crônica (de até 1 ano) pode ser necessário para detectar lesões tumorais iniciais.

(4) Substâncias endógenas administradas essencialmente como terapias repositórias (isto é, níveis fisiológicos) particularmente se houver experiência clínica com produtos similares (por exemplo, insulinas animais, hormônio do crescimento derivado da pituitária e calcitonina).

(5) Substâncias utilizadas por um período curto de exposição ou de maneira infreqüente (exemplo, anestésicos ou contrastes e agentes diagnósticos radio-marcados).

Casos especiais devem ser considerados:

(1) Peptídeos endógenos ou proteínas e seus análogos produzidos por síntese química, por extração/purificação de uma fonte animal/humana ou por métodos biotecnológicos

como tecnologia de DNA recombinante podem requerer consideração especial. A condução de ensaios de carcinogenicidade pode ser importante nos casos de:

a) produtos que demonstrem diferenças significativas nos efeitos biológicos quando comparados aos efeitos dos compostos naturais;

b) produtos com modificações estruturais importantes;

c) produtos cuja administração produza um aumento significativo em sua disponibilidade local ou sistêmica quando comparados aos produtos naturais em seres humanos.

(2) Para diferentes sais, ácidos ou bases partes do mesmo grupo químico funcional, onde haja ensaios anteriores de carcinogenicidade, devem-se demonstrar evidências de que não haja diferenças significativas na farmacodinâmica, farmacocinética ou toxicidade. Entretanto quando houver diferenças nos níveis de exposição e conseqüente toxicidade, então ensaios adicionais podem ser realizados para se determinar a necessidade ou não da realização de ensaios adicionais de carcinogenicidade.

(3) Estudos de mecanismo de ação são úteis para avaliar a relevância dos achados tumorais nos animais, para a segurança humana. Testes adicionais podem ser necessários, quando houver necessidade da confirmação da presença ou ausência de potencial carcinogênico a seres humanos, investigando-se os mecanismos de ação.

Momento de Submissão de estudos de carcinogenicidade

Estudos de carcinogenicidade são recomendados em casos específicos. Caso tais estudos sejam necessários, estes deverão ser apresentados no momento do registro do produto para comercialização. Apenas em circunstâncias em que haja uma causa de preocupação de risco de carcinogenicidade, os resultados de tais estudos devem ser submetidos para suporte aos ensaios clínicos. Medicamentos desenvolvidos para tratar doenças graves podem ter seus estudos de carcinogenicidade concluídos após aprovação do registro.

8. Estudos de Interesse para a Avaliação da Segurança Farmacológica

Definição/Objetivo

Os estudos de interesse para a avaliação da segurança farmacológica são aqueles que pesquisam os potenciais efeitos farmacodinâmicos indesejáveis da substância teste nas funções fisiológicas dos diversos sistemas orgânicos em relação ao nível de exposição.

A partir desses estudos são avaliadas funções vitais desenvolvidas pelos sistemas: nervoso central, cardiovascular e respiratório. Quando necessário, deve-se também avaliar o sistema urinário, nervoso autônomo, digestório, endócrino, imune e muscular esquelético.

Via de Administração

A mesma via a ser administrada em humanos, quando possível.

Dosagem:

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.

Metabólitos:

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.

Estudos Realizados:

- A. Estudos para avaliar a segurança farmacológica da substância no Sistema Nervoso Central
- B. Estudos para avaliar a segurança farmacológica da substância no Sistema Respiratório
- C. Estudos para avaliar a segurança farmacológica da substância no Sistema Cardiovascular

A. Estudos para avaliar a segurança farmacológica da substância teste no Sistema Nervoso Central:

A.1. Modelo animal a ser utilizado:

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.

A.2. Parâmetros a serem avaliados:

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.

B. Estudos para avaliar a segurança farmacológica da substância no Sistema Respiratório:

B.1. Parâmetros a serem avaliados:

O sistema respiratório deve ser avaliado com base na frequência respiratória e outras medidas de função respiratórias (como volume corrente ou saturação da hemoglobina). Para avaliação do sistema respiratório, observações clínicas não são geralmente adequadas, mas sim a quantificação dos parâmetros supracitados por metodologia adequada.

C. Estudos para avaliar a segurança farmacológica da substância teste no Sistema Cardiovascular:

Para avaliação do sistema cardiovascular devem ser estimadas: pressão sanguínea, frequência cardíaca e eletrocardiograma. Avaliações *in vivo*, *in vitro* e/ou *ex vivo*, incluindo métodos para detecção de anormalidades de repolarização e condução devem também ser consideradas. Para avaliação do prolongamento da repolarização ventricular pode-se utilizar o ensaio IKR *in vitro* e o ensaio QT *in vivo*.

C.1. Estudos eletrofisiológicos in vitro:

Modelo animal a ser utilizado:

Empregam-se preparação de células únicas (por exemplo: sistema de expressão heteróloga, cardiomiócitos desagregados) ou de múltiplas células (por exemplo: Fibras de Purkinje, músculos papilares, coração intacto). 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.

C.2. Estudos eletrofisiológicos, *in vivo*:

Modelo animal a ser utilizado:

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*.

Parâmetros a serem Avaliados:

O intervalo QT do Eletrocardiograma é o desfecho mais comumente 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.

Observações:

Quando a ocorrência de eventos adversos durante ensaios clínicos, suscitar preocupação para a segurança humana, informações adicionais deverão ser obtidas da literatura e/ou de novos estudos experimentais *in vitro* ou *in vivo* tais como os mencionados abaixo:

Estudos Complementares:

Sistema Nervoso Central: avaliações de farmacologia comportamental, aprendizado e memória, estudos de *binding* para ligantes específicos, neuroquímica, exames visuais, auditivos e/ou eletrofisiológicos.

Sistema Cardiovascular: avaliações de débito cardíaco, contratilidade ventricular, resistência vascular, efeitos de substâncias endógenas e/ou exógenas sobre as respostas cardiovasculares.

Sistema Respiratório: avaliações de resistência e complacência das vias aéreas, pressão arterial pulmonar, pH sanguíneo, gasometria.

Sistema Urinário: avaliações de volume urinário, gravidade específica, osmolalidade, pH, fluidos/balanço eletrolítico, proteínas, citologia, hemácias, bem como determinações químicas de uréia, creatinina, proteínas plasmáticas.

Sistema Nervoso Autônomo: avaliações de ligação a receptores relevantes para o sistema nervoso autônomo, respostas funcionais para agonistas ou antagonistas *in vivo* ou *in vitro*, estimulação direta dos nervos autônomos e medição das respostas cardiovasculares e variabilidade do ritmo cardíaco.

Sistema Digestório: avaliações de secreção gástrica, potencial de lesão gastrointestinal, secreção biliar, tempo de trânsito *in vivo*, contração ileal *in vitro*, pH gástrico.

Outros Sistemas: avaliações de musculatura esquelética, funções imunes e endócrinas.

Condições em que estudos de segurança farmacológica não são necessários:

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 seja baixa.

Em casos de agentes citotóxicos administrados em pacientes vítimas de câncer em estágio terminal onde o benefício se sobressaia ao risco induzido pela substância teste, pode ser avaliado, pela Anvisa, a inicialização de pesquisas em seres humanos sem a devida conclusão desses estudos. Estudos adicionais de interesse para a avaliação da segurança farmacológica podem ser realizados durante a Pesquisa Clínica para esclarecer eventos adversos suspeitos ou observados durante os estudos não clínicos ou clínicos. 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 receptor alvo, muitas vezes é suficiente avaliar a segurança farmacológica como parte dos parâmetros de toxicidade e/ou estudos farmacodinâmicos; portanto, estudos 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 receptor-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.

9. Estudos de Toxicocinética

Definição/Objetivo:

Toxicocinética é definida como a geração de dados farmacocinéticos tanto como um componente integral na condução de estudos de toxicidade não clínica como em estudos de suporte especificamente desenhados para avaliar a exposição sistêmica.

Os dados obtidos desses estudos podem ser utilizados na interpretação de achados toxicológicos e na avaliação de sua relevância para a segurança clínica. 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 podem-se considerar: relato da exposição obtida em estudos de toxicidade para achados toxicológicos/contribuição para a avaliação da relevância desses achados 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 em conjunto com achados toxicológicos contribuam para o desenho de estudos não clínicos de toxicidade subsequentes.

Ensaio de metabolismo *in vitro* e dados de ligação às proteínas plasmáticas em animais e humanos, além de dados de exposição sistêmica nas espécies utilizadas em ensaios de toxicidade de doses repetidas, devem ser, em geral, avaliados antes do início dos ensaios clínicos. Informações sobre farmacocinética (ex. absorção, distribuição, metabolismo e excreção), nas espécies testadas e informações bioquímicas *in vitro* relevantes às interações potenciais da substância teste devem estar disponíveis antes da exposição a grande número de seres humanos ou tratamentos de longa duração (normalmente, antes da Fase III).

A caracterização não clínica de metabólito(s) humano(s) deve(m) ser fornecida(s) somente quando tal(is) metabólito(s) for(em) observado(s) em exposição maior que 10% em relação ao total de exposição à substância e em níveis em humanos significativamente maiores que a máxima exposição observada nos estudos de toxicidade.

Tais estudos devem ser conduzidos antes da Fase III. Alguns metabólitos não são toxicologicamente relevantes e sua caracterização não é requerida. A caracterização não clínica de metabólitos identificados como causa de preocupação toxicológica deve ser considerada caso a caso.

Modelo animal a ser utilizado:

Deve-se utilizar o modelo animal especificado para os estudos não clínicos de toxicidade e segurança correspondentes. O número de animais a ser utilizado deve ser o mínimo consistente com a produção adequada de dados de toxicocinética. Quando machos e fêmeas são utilizados no estudo, normalmente é estimada a exposição em animais de ambos os sexos, a menos que haja justificativa para não fazê-lo.

Estudos de toxicocinética 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).

O número de animais a ser utilizado deve ser o mínimo necessário para a geração adequada de dados toxicocinéticos. Dados toxicocinéticos não são necessários para estudos de diferentes durações, caso a posologia permaneça inalterada.

Via de Administração:

Similares àsquelas preconizadas para uso humano, quando possível.

Dosagem:

O estabelecimento de níveis de dose nos ensaios de toxicidade é largamente direcionado por achados de toxicidade além das respostas farmacodinâmicas nas espécies testadas. Entretanto, os seguintes princípios toxicocinéticos podem contribuir para o estabelecimento de níveis de dose:

Baixa: Nível de dose sem efeito tóxico.

Média: Múltiplo apropriado da exposição de menor dose ou fração da maior dose.

Alta: Normalmente determinada por considerações toxicológicas.

Os tempos da coleta de amostra de fluidos corpóreos devem ser tão freqüentes quanto necessário, sem interferir com a condução normal do estudo ou causar estresse fisiológico desnecessário aos animais. Em cada estudo, o número de vezes da realização

da coleta de amostras deve ser justificado demonstrando ser adequado para que se estime a exposição. A justificativa deve ser baseada nos dados cinéticos obtidos em estudos de toxicidade anteriores, estudos pilotos, estudos distintos de mesmo modelo animal, ou em outros modelos que possibilitem a extrapolação.

Período de Observação:

O período suficiente para avaliar a toxicocinética da substância, no modelo animal estudado.

Parâmetros a serem avaliados:

A quantificação da exposição pode ser representada por concentração plasmática (soro ou sangue) ou pela área sob a curva concentração da substância X tempo (AUC).

Outras medidas, como por exemplo, excreções urinárias podem ser mais apropriadas para certas substâncias. Alguns parâmetros derivados, por exemplo, biodisponibilidade, meia-vida, volume de distribuição da substância teste, podem ser importantes na interpretação dos dados de toxicocinética. Portanto, a seleção dos parâmetros e tempo de coleta deve ser feita, caso a caso, considerando-se os princípios observados neste Guia.

Observações:

O desenvolvimento de um medicamento é um processo dinâmico que envolve intercâmbio de informações obtidas em estudos clínicos e não clínicos. Por isso, não se recomenda a adoção de procedimentos rígidos e pormenorizados para a submissão de estudos toxicocinéticos. A coleta de dados toxicocinéticos pode não ser necessária em todos os estudos e o julgamento científico irá indicar os casos em que esses dados podem ser úteis. A necessidade de obter dados toxicocinéticos e de avaliar a exposição em cada estudo individual de toxicidade deve ser baseada em uma abordagem flexível e estabelecida de forma individualizada, garantindo-se a produção de informações suficientes para avaliar os riscos e a segurança da exposição de seres humanos.

1- Seguem abaixo considerações sobre a análise toxicocinética a ser aplicada nos diversos estudos toxicológicos:

Estudos de Toxicidade de Dose Única:

Estudos toxicocinéticos, se necessários, podem ser realizados após a finalização dos

estudos de toxicidade de dose única para responder questões específicas que surgiram durante o estudo. Resultados dos estudos cinéticos de dose única podem auxiliar na escolha da formulação e na predição da medida e duração da exposição durante o intervalo de dose. Isto poderá auxiliar na seleção apropriada dos níveis de doses a serem utilizados em estudos posteriores.

Esses estudos muitas vezes são realizados em uma fase muito inicial de desenvolvimento, antes que um método bioanalítico tenha sido desenvolvido, portanto o monitoramento toxicocinético desses estudos, normalmente não é possível.

As amostras de plasma em tais estudos podem ser colhidas e armazenadas para análise posterior, se necessário. Os dados adequados da estabilidade do analito na matriz amostrada seriam então necessários. Alternativamente, estudos toxicocinéticos adicionais podem ser realizados após a conclusão de um estudo de toxicidade de dose única, a fim de responder a perguntas específicas que podem surgir.

Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas:

Para esses estudos, o regime de tratamento e as espécies a serem utilizadas devem ser selecionados considerando-se os princípios da farmacocinética e da farmacodinâmica. Isso pode não ser possível nos estudos iniciais quando dados farmacocinéticos provenientes de animais ou de seres humanos ainda não estão disponíveis.

A toxicocinética deve ser incorporada apropriadamente no desenho desses estudos.

Estudos de Genotoxicidade: Em casos de resultados negativos de estudos de genotoxicidade *in vivo*, pode ser necessária a demonstração da exposição sistêmica na espécie utilizada ou a caracterização da exposição em tecido indicado.

Estudos de Carcinogenicidade:

É necessária a estimativa da exposição sistêmica para que haja a confirmação de que seja possível extrapolar dados do modelo animal para o modelo humano. O regime de tratamento e a espécie a ser selecionada devem, tanto quanto possível, ser determinados considerando as informações farmacocinéticas e toxicocinéticas disponíveis.

Estudos de Toxicidade Reprodutiva:

É preferível ter algumas informações da farmacocinética antes de se iniciar os estudos de

toxicidade reprodutiva, uma vez que, essas podem sugerir a necessidade de ajustes na escolha da espécie, no desenho do estudo e na dose determinada.

Para estudos com fêmeas prenhes e lactantes, o regime de tratamento durante a exposição deve ser selecionado com base em achados toxicológicos, princípios farmacocinéticos e toxicocinéticos. Deve-se considerar o fato de que a cinética poderá diferir entre fêmeas prenhes e não prenhes. As avaliações toxicocinéticas podem envolver exposições de embriões, fetos ou recém-nascidos. A secreção da substância no leite pode ser avaliada para definir o papel da exposição em recém nascidos. Em algumas situações, estudos adicionais podem ser necessários ou apropriados para avaliar a transferência embrio/fetal e a secreção da substância no leite.

2-Para análise toxicocinética devem-se considerar fatores como: ligação às proteínas, propriedades receptoras e perfil metabólico.

3-Em alguns casos pode ser necessária a avaliação de metabólitos como, por exemplo:

- Quando a substância é uma pró-substância teste,
- Quando a metabolização da substância resulta em um ou mais metabólitos toxicologicamente ou farmacologicamente ativos,
- Quando a substância é extensamente metabolizada.

4-Parâmetros cinéticos, como por exemplo, níveis de pico plasmático, AUC (área sob a curva concentração da substância X tempo), e informações sobre a Máxima Dose Tolerada (MTD) em animais utilizados para estudos pré-clínicos, auxiliam na definição de doses a serem administradas durante a Fase 1 da Pesquisa Clínica.

10. Estudos não clínicos de segurança para o desenvolvimento e registro de ADF (Associação em Dose Fixa) de medicamentos sintéticos e semi-sintéticos de uso oral.

Durante o desenvolvimento de uma associação, os estudos não clínicos possuem o objetivo de caracterizar o efeito do uso combinado dos ativos do ponto de vista farmacológico, farmacocinético e toxicológico, identificando efeitos aditivos, sinérgicos ou

antagônicos da associação. A necessidade e a extensão de estudos não clínicos com a associação devem ser definidas com base nas características individuais dos princípios ativos, no potencial de interações entre esses ativos, nos estudos não clínicos e clínicos já existentes tanto para associação quanto para as monodrogas e no objetivo terapêutico dessa associação. Uma avaliação desse conjunto de fatores é necessária para o delineamento do desenvolvimento não clínico do produto ou para se concluir que a realização de estudos não clínicos com a associação não é necessária.

Independente da avaliação, a realização de estudos não clínicos de segurança é necessária quando a formulação possuir um ou mais excipientes cuja segurança não esteja bem estabelecida ou quando o perfil de impurezas da associação é significativamente diferente dos produtos contendo as monodrogas.

10.1. NOVAS ASSOCIAÇÕES CONTENDO MONODROGAS JÁ REGISTRADAS

10.1.1. Considerações gerais

As considerações que serão feitas neste item partem do pressuposto que cada princípio ativo separadamente apresenta sua eficácia e segurança bem estabelecida. Se houverem preocupações específicas com relação à segurança das monodrogas ou lacunas com relação aos estudos não clínicos das mesmas, estudos adicionais poderão ser necessários.

É necessário que se faça uma avaliação dos medicamentos que estão registrados frente à associação em desenvolvimento, verificando se os dados clínicos e não clínicos já disponíveis são suficientes para subsidiar a indicação, dose terapêutica, posologia, duração do tratamento e população alvo, propostos para a associação. Por exemplo, medicamentos registrados para uso agudo podem não possuir estudos não clínicos para subsidiar uma indicação de uso crônico. Quando os dados existentes para as monodrogas não forem condizentes com as características da associação proposta, poderá ser necessária a realização de estudos não clínicos além dos aqui descritos.

Para associações constituídas de princípios ativos já registrados para os quais já existam evidências suficientes para comprovação da eficácia e segurança da associação, estudos de segurança com a combinação em animais geralmente não são necessários. Para as demais associações as considerações sobre os estudos não clínicos serão discutidas nos itens seguintes.

10.1.2. Avaliação da segurança da associação

Se os dados existentes para cada monodroga separadamente forem condizentes com a indicação, dose terapêutica, posologia, duração do tratamento e população alvo pleiteados para associação, sugere-se que alguns fatores relevantes para a avaliação da segurança sejam considerados para identificar se são necessários estudos não clínicos adicionais para a associação e quais estudos não clínicos precisarão ser conduzidos. A avaliação com base nesses itens permite identificar possíveis preocupações clínicas com relação à segurança da associação que suscitem a necessidade de estudos não clínicos adicionais.

- a) Informações disponíveis sobre o uso da associação em humanos: Estes dados podem ser suficientes para a avaliação da segurança da associação ou apontar pontos que podem ser motivo de preocupação clínica e precisem ser mais bem estudados.
- b) Possibilidade de interações farmacodinâmicas: As monodrogas podem ter afinidade pelos mesmos receptores biológicos ou produzirem efeitos fisiológicos semelhantes, relacionados ou não ao seu mecanismo de ação.
- c) Possibilidade de interações farmacocinéticas: Uma monodroga pode alterar a absorção ou excreção da outra, mudar sua distribuição em um ou mais tecidos, ou alterar sua taxa de metabolização. As monodrogas podem competir entre si pela ligação às proteínas plasmáticas, aumentando assim a fração livre no plasma de uma delas e sua distribuição para os tecidos.
- d) Possibilidade de interações toxicológicas: Por exemplo, princípios ativos que possuem toxicidade no mesmo órgão alvo. Nesses casos, a toxicidade da associação no órgão alvo pode ser mais severa, e as doses estabelecidas como não tóxicas para as monodrogas podem não se aplicar para o uso combinado.
- e) Margem de segurança para cada monodroga da associação: Se um ou mais princípios ativos possuírem faixa terapêutica estreita, a possibilidade de interações farmacocinéticas possui especial importância na avaliação da segurança da associação, principalmente se o efeito tóxico dos ativos for irreversível ou não puder ser monitorado clinicamente.

- f) Possibilidade competição entre as monodrogas, alteração na atividade ou níveis plasmáticos de uma mesma enzima ou outras moléculas intracelulares.
- g) Possibilidade de interações químicas: Uma molécula pode modificar quimicamente outra (através de oxidação, metilação, etc) levando ao surgimento de uma nova entidade molecular.
- h) Possibilidade de um fármaco comprometer a efetividade do outro, principalmente em indicações para doenças graves com risco de morte.

10.1.3. Estudos de Toxicidade Geral

Para associações constituídas de princípios ativos registrados para os quais já exista adequada experiência clínica do uso combinado em humanos, os estudos de toxicidade geralmente não são necessários para subsidiar os estudos clínicos que serão conduzidos com a associação ou o registro do medicamento, desde que não haja nenhuma preocupação com relação à toxicidade da associação mediante avaliação de acordo com o item 10.1.2 (por exemplo, toxicidade sob o mesmo órgão alvo) ou outro motivo que represente grave preocupação clínica (por exemplo, um dos componentes da formulação pertencer a uma classe terapêutica que esteja associada a um tipo específico de toxicidade).

A margem de segurança das monodrogas e a capacidade de se monitorar os eventos adversos relacionados à toxicidade em humanos devem ser consideradas na decisão sobre a condução ou não dos estudos. Quando conduzidos para avaliar efeitos toxicológicos específicos, os estudos não clínicos devem ser feitos antes do início dos estudos clínicos com a associação.

Para associações de duas ou mais moléculas já registradas para as quais não haja adequada experiência clínica do uso combinado é necessária à realização de estudos não clínicos de toxicidade com a associação, tais estudos são necessários para subsidiar os estudos clínicos de larga escala e longa duração assim como o registro. Para avaliação da toxicidade da associação, um estudo “ponte” pode ser apropriado desde que tenha duração suficiente para esclarecer a preocupação com relação à toxicidade da associação. Para subsidiar 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 com maior duração irá depender dos efeitos observados no estudo da combinação de fármacos quando comparados aos induzidos pelas monodrogas. Dependendo do tempo de tratamento que será proposto para a associação, estudos com tempo de duração menor poderão ser suficientes para subsidiar o registro.

Geralmente, os estudos ponte podem ser realizados em apenas uma espécie animal relevante. A escolha do modelo mais relevante deve ser cientificamente justificada com base em aspectos farmacodinâmicos, farmacocinéticos, de metabolismo, órgãos alvos e sensibilidade toxicológica. Testes adicionais em outras espécies podem ser necessários caso um efeito tóxico não esperado seja identificado. O desenho dos estudos não clínicos com a associação irá depender das características farmacológicas, toxicológicas e farmacocinéticas das monodrogas individualmente e das indicações pleiteadas, população alvo pretendida e outros dados disponíveis para a associação. Devem ser delineados de maneira que se possa fazer uma comparação dos dados obtidos para a associação com os dados das monodrogas. A inclusão de braços comparadores com altas doses das monodrogas pode ser considerada.

10.1.4. Estudos de Genotoxicidade

Os estudos de genotoxicidade para a associação geralmente não são necessários se os componentes individuais da formulação tiverem sido adequadamente testados com relação a esse aspecto.

Quando algum dos princípios ativos da associação possui potencial genotóxico, estudos adicionais para avaliar a possibilidade de potencialização desse efeito podem ser necessários. Uma avaliação caso a caso com base nas informações disponíveis para cada monodroga deve ser feita para avaliar como a possibilidade de aumento da genotoxicidade pode influenciar no balanço risco/benefício do uso da associação para a indicação pleiteada.

10.1.5. Estudos de Carcinogenicidade

Os estudos de carcinogenicidade para a associação geralmente não são necessários se os componentes individuais da formulação tiverem sido adequadamente testados com relação a esse aspecto. O potencial de carcinogenicidade da associação pode ser avaliado com base nas informações disponíveis para as monodrogas.

Quando algum dos princípios ativos da associação possuir potencial carcinogênico,

estudos adicionais para avaliar a possibilidade de potencialização desse efeito podem ser necessários. Uma abordagem pode ser a inclusão nos estudos de toxicidade repetida de desfechos relevantes para a avaliação de carcinogenicidade, para que se possa avaliar qualquer preocupação clínica com relação a esse ponto. Os estudos de carcinogenicidade são recomendados para associações de indicação para uso crônico quando nos achados não clínicos for observada incidência estatisticamente significativa de lesões pré-neoplásicas em órgãos ou tecidos.

10.1.6. Estudos de Toxicidade Reprodutiva

Os estudos de toxicidade reprodutiva para a associação geralmente não são necessários se os componentes individuais da formulação tiverem sido adequadamente testados com relação a esse aspecto. A decisão pela necessidade ou não de estudos de toxicidade reprodutiva irá depender das propriedades de cada ativo e do potencial de interação entre eles.

Nos casos em que a população alvo da associação incluir mulheres em idade fértil e os estudos com as monodrogas já tiverem apontado risco embrio-fetal, estudos com a associação não serão necessários apenas se o risco para o desenvolvimento humano já tiver sido identificado. Se os estudos de desenvolvimento embrio-fetal das monodrogas não tiverem demonstrado nenhum risco ao desenvolvimento humano para nenhum dos fármacos individuais, os estudos não clínicos com a associação somente precisam ser feitos se houver alguma suspeita com base nas propriedades de cada fármaco de que há um risco do uso da combinação para humanos. Quando necessário, o estudo pode ser conduzido na espécie mais apropriada, baseando-se no conhecimento prévio que se tem dos fármacos. Caso um risco significativo seja identificado somente em um trimestre da gravidez os estudos devem avaliar os efeitos da associação nos outros trimestres da gravidez também.

10.1.7. Estudos de Segurança Farmacológica

Os estudos de segurança farmacológica para a associação geralmente não são necessários se os componentes individuais da formulação tiverem sido adequadamente testados com relação a esse aspecto. A necessidade de condução de estudos de segurança farmacológica com a associação irá depender dos tipos de interações que podem ocorrer entre os princípios ativos. Os estudos podem ser necessários quando os princípios ativos que constituirão a associação possuem toxicidade no mesmo órgão alvo

ou sistema (por exemplo: cardíaco, respiratório, SNC, etc), quando um ou mais ativos pertencem a classes terapêuticas associadas com algum tipo específico de toxicidade (por exemplo: prolongamento do intervalo QT), quando a indicação inclui população com algum tipo de comprometimento (por exemplo: pacientes com insuficiência renal) ou quando qualquer outra preocupação clínica for identificada.

10.2 Novas associações contendo uma ou mais moléculas novas no país

Nos casos em que um ou mais princípios ativos da associação forem novas moléculas no país, os estudos não clínicos devem seguir as mesmas diretrizes de desenvolvimento e registro de um novo medicamento.

11. Referências

- 1- Cazarin K. C. C., Corrêa C. L., Zambrone F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 40, n. 3, jul./set., 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/04.pdf>. Acesso em: 13 out. 2011.
- 2- EUROPEAN MEDICINES AGENCY -EMA. Single Dose Toxicity – 3BS1a. London: 1987. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>. Acesso em: 03 set. 2008.
- 3- EUROPEAN MEDICINES AGENCY -EMA. Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products – CPMP/SWP/997/96. London: 1998. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm> Acesso em: 15 jul. 2008.
- 4- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA. Guideline on repeated dose toxicity - CPMP/SWP/1042/99 REV 1 CORR. Disponível em: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf> Acesso em: 11 out. 2011.
- 5- EUROPEAN MEDICINES AGENCY -EMA. Note for Guidance on Non Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products – CPMP/SWP/2145/00. London: 2001. Disponível em: <http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>> Acesso em: 10 nov. 2007.
- 6- EUROPEAN MEDICINES AGENCY -EMA. Note for Guidance on Carcinogenic Potencial – CPMP/SWP/2877/00. London: 2002. Disponível em: <http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>> Acesso em:

01 nov. 2007.

- 7- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMEA. Guideline on The Non-clinical Development of Fixed Combinations of Medical Products -01 de agosto de 2008. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/25849805enfin.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- 8- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guidance for Industry -Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals. Maryland: 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2008.
- 9- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Draft Guidance for Reviewers on the Integration of Study Results to Assess Concerns about Human Reproductive and Developmental Toxicities; Availability. Maryland: 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/111301a.htm>>. Acesso em: 20 out. 2007.
- 10-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. 21 CFR 58 - Good Laboratory Practice Regulations. Maryland:2012. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=58&showfr=1>. Acesso em: 13 mai. 2012.
- 11-FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION-FDA-Nonclinical Safety Evaluation of Drug or Biologic Combinations – março/2006. Disponível em <[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079243.p df](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079243.pdf) > Acesso em: 01 dez. 2006.
- 12- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2). Geneva: 1993. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5_R2/Step4/S5_R2__Guideline.pdf>. Acesso em: 15 out. 2007.
- 13- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals & Limit Dose – S1C(R2). Geneva: 1994a. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1C_R2/Step4/S1C_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2012.
- 14-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies – S3A. Geneva: 1994b. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/Step4/S3A_Guideline.pdf>. Acesso em: 01 mai. 2012.
- 15-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies – S3B. Geneva: 1994c. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3B/Step4/S3B_Guideline.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2011.

- 16-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Guideline on the need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals – S1A. Geneva: 1995. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1A/Step4/S1A_Guideline.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2011.
- 17- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals – S1B. Geneva: 1997. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1B/Step4/S1B_Guideline.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2011.
- 18-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing) – S4. Geneva: 1998. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S4/Step4/S4_Guideline.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2012.
- 19-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. M3 (R2): Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. Geneva: 2009. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 01 ago 2009.
- 20-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals – S7A. Geneva: 2000. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2012.
- 21-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. The Non Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals – S7B. Geneva: 2005. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2007.
- 22-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Geneva: 2011. Disponível em: <
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf>. Acesso em: 01 mai. 2012.
- 23-Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. DOU 9 de outubro de 2008.
- 24-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. Cardiotoxicity Study in Cynomolgus Monkeys. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 1996a.
- 25-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. Neurotoxicity Study of in Beagle Dogs. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 1996b.

- 26-NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. Single Dose Toxicity of in Beagle Dogs. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 1997.
- 27-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. Cardiotoxicity Study of in Beagle Dogs. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003a.
- 28-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. 14 -Day Toxicity Study of in Beagle Dogs. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003b.
- 29- NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. 28 -Day Toxicity Study of in Beagle Dogs. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003c.
- 30-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. 14 -Day Toxicity Study of in Rats. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003d.
- 31-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. 28 -Day Toxicity Study of in Rats. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003e.
- 32-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. Pharmacokinetics and Dose Range-Finding Study of in Beagle Dogs. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003f.
- 33-NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. Single Dose Toxicity of in Mice. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003g.
- 34-NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. Single Dose Toxicity of in Rats. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003h.
- 35-NATIONAL CANCER INSTITUTE -NCI. NCI Mission Statement. Maryland: s.d. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/aboutnci/overview/mission>>. Acesso em: 15 dez. 2006.
- 36-National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Challenging Requirements for Acute Toxicity Studies: Workshop Report; May 2007. Disponível em: <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=559>. Acesso em 13 out. 2011.
- 37-OECD Principles of Good Laboratory Practice. Paris: 1998. Disponível em: <[http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/01E88455.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/01E88455.PDF)>. Acesso em 10 mai. 2008.
- 38-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Dermal Irritation/Corrosion (404), 24 April 2002. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg404.pdf>. Acessado em 13 out. 2011.
- 39-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Dermal Toxicity (402), 24 Feb 1987. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740201e.pdf?expires=1318537456&id=id&acname=freeContent&checksum=3949D5E55A286EC962F44464ADB741BD> Acessado

em 13 out. 2011.

- 40-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Eye Irritation/Corrosion (405), 24 April 2002. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740501e.pdf?expires=1318537523&id=id&accname=freeContent&checksum=F0C3DDF8869E63072F152C83F2A4D026> . Acessado em 13 out. 2011.
- 41-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Inhalation Toxicity (403), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740301e.pdf?expires=1318537586&id=id&accname=freeContent&checksum=6A43CCBB45D32EDF8DC7869CC220B010>. Acessado em 13 out. 2011.
- 42- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (423), 17 Dec 2001. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742301e.pdf?expires=1318537624&id=id&accname=freeContent&checksum=5DAE79EBCEF850C85122E0CA6D22A6C1>. Acessado em 13 out. 2011.
- 43-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (420), 17 Dec 2001. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742001e.pdf?expires=1318537670&id=id&accname=freeContent&checksum=5058A1B89C2D1EDEEA3A755F81A5575D>. Acessado em 13 out. 2011.
- 44-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity –Up-and-Down-Procedure (UDP) (425), 3 October 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742501e.pdf?expires=1318537711&id=id&accname=freeContent&checksum=210817DF622E4460C7332DAEBF19CFC5>. Acessado em: 13 out. 2011.
- 45-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Carcinogenicity Studies (451), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9745101e.pdf?expires=1318537762&id=id&accname=freeContent&checksum=F1EA4C94AED7D2F8244A8A3EE70CC004>. Acessado em: 13 out. 2011.
- 46-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Chronic Toxicity Studies (452), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9745201e.pdf?expires=1318537832&id=id&accname=freeContent&checksum=048DE0AED9D2F7D0420E1B8D6751BA61>. Acessado em: 13 out. 2011.
- 47-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Combined Chronic Toxicity / Carcinogenicity Studies (453), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9745301e.pdf?expires=1318537865&id=id&accname=freeContent&checksum=4DEC16634F272DEB08019573727D4A23>. Acessado em 13 out. 2011.
- 48-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Combined Repeated Dose Toxicity

Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (422), 22 Mar 1996. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742201e.pdf?expires=1318537910&id=id&accname=freeContent&checksum=E76354E628332953CD45198DBA78569A>. Acessado em 13 out. 2011.

49-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (435), 19 July 2006. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg435.pdf>. Acessado em 13 out. 2011.

50-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test (431), 13 April 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9743101e.pdf?expires=1318537955&id=id&accname=freeContent&checksum=BAD375F6B10E1BEA90623094D293BE5B>. Acessado em 13 out. 2011.

51-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) (430), 13 April 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9743001e.pdf?expires=1318537984&id=id&accname=freeContent&checksum=D0C07CC48DB8B4DCBCDEEE579AD41EB3>. Acessado em 13 out. 2011.

52-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. One-Generation Reproduction Toxicity Study (415), 26 May 1983. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/18/12/1948458.pdf>. Acessado em: 18 out. 2011.

53-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Prenatal Developmental Toxicity Study (414), 22 Jan 2001. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9741501e.pdf?expires=1318538019&id=id&accname=freeContent&checksum=35DD35D9B6402221E4D619490710EED2>. Acessado em 13 out. 2011.

54-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (407), 3 Oct 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740701e.pdf?expires=1318538104&id=id&accname=freeContent&checksum=ADD9F533ED0642E7C11CC934908F4A91>. Acessado em 13 out. 2011.

55-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents (409), 21 Sep 1998. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740901e.pdf?expires=1318538127&id=id&accname=freeContent&checksum=EB03ECC65B46B6EBB4888D27CA272A86>. Acessado em 13 out. 2011.

56-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents (408), 21 Sep 1998. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740801e.pdf?expires=1318538151&id=id&accname=freeContent&checksum=85C9B9FAFBA80A37C0F4542AA4DEC662>. Acessado em 13 out. 2011.

- 57-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study (410), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9741001e.pdf?expires=1318538180&id=id&accname=freeContent&checksum=592C5DA2E204AA06E246467B5C4EF0A3>. Acessado em 13 out. 2011.
- 58-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study(412), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9741201e.pdf?expires=1318538256&id=id&accname=freeContent&checksum=141AB112E3E1B626EE6097406B589869>. Acessado em 13 out. 2011.
- 59-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (421), 27 Jul 1995. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742101e.pdf?expires=1318538265&id=id&accname=freeContent&checksum=B69EE9C434D87790EBA88E9E0C97D6DE>. Acessado em 13 out. 2011.
- 60-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: in vitro Method (428), 13 April 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742801e.pdf?expires=1318538300&id=id&accname=freeContent&checksum=35156FCA2E22387B42D2B3D49279CC40>. Acessado em 13 out. 2011.
- 61-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: in vivo Method (427), 13 April 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742701e.pdf?expires=1318538307&id=id&accname=freeContent&checksum=4F1C202E1D08BEE24B9859EB615BD57B>. Acessado em 13 out. 2011.
- 62-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study (411), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9741101e.pdf?expires=1318538325&id=id&accname=freeContent&checksum=2D1ACC43F262E8E46C4B0E4320D80E07>. Acessado em 13 out. 2011.
- 63-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study (413), 12 May 1981. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9741301e.pdf?expires=1318538380&id=id&accname=freeContent&checksum=146DC7DC6BB8EC7855BB3070CEF3E30A>. Acessado em 13 out. 2011.
- 64-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Toxicokinetics (417), 4 April 1984. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9741701e.pdf?expires=1318538385&id=id&accname=freeContent&checksum=2AB0FDA97DFBE7CD045A2750EEEE3AC4>. Acessado em 13 out. 2011.
- 65-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties (440), 16 October 2007. Disponível

em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9744001e.pdf?expires=1318538397&id=id&accname=freeContent&checksum=46D816A509EA93DDEC424FECB829CEE>.
Acessado em 13 out. 2011.

- 66-Robinson S et al. A European pharmaceutical company initiative challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in pharmaceutical drug development. Regul Toxicol Pharmacol 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230007001924>. Acessado em: 13 out. 2011.
- 67-Sakai T, Takahashi M, Mitsumori K, Yasuhara K, Kawashima K, Mayahara H et al. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by 2-week repeated dose toxicity studies in rats. Overview of the studies. J Toxicol Sci 2000; 25:1-21.
- 68-WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Handbook: Good Laboratory Practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development Geneva: TDR/WHO, 2001. 226p. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/good-laboratory-practice-handbook/pdf/glp-handbook.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2008.
- 69-WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Handbook – Non Clinical Safety Testing. Geneva: TDR/WHO, 2004. 117p. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm>. Acesso em: 03 nov. 2007.