



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA  
MESTRADO PROFISSIONALIZANTE – VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

---

**PROPOSTA DE GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE  
SEGURANÇA, NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS  
ANTINEOPLÁSICOS**

**FLÁVIA REGINA SOUZA SOBRAL**

Flávia Regina Souza Sobral

---

**PROPOSTA DE GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE  
SEGURANÇA, NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS  
ANTINEOPLÁSICOS**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação do Instituto  
de Saúde Coletiva da Universidade Federal  
da Bahia

Área de Concentração: Vigilância Sanitária

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Andrade Nishioka

Brasília – Distrito Federal  
2006

---

S 677 Sobral, Flávia Regina Souza.

Proposta de Guia para a realização de estudos não clínicos de segurança, necessários ao desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos / Flávia Regina Souza Sobral. – Salvador: F.R.S.Sobral, 2007.

109p.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Sérgio Andrade Nishioka.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia.

1. Vigilância Sanitária. 2. Estudos Não Clínicos de Segurança. 3. Estudos Pré-Clínicos. 4. Medicamentos Antineoplásicos. 5. Pesquisa Clínica. 6. Pesquisa e Desenvolvimento I. Título.

CDU 614.3

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força nas horas mais difíceis, ao carinho e compreensão do meu marido Fernando, a minha mãe por sempre ter acreditado em mim, ao exemplo e dignidade do meu orientador Dr. Sérgio Nishioka, ao Dr. Francisco Paumgarten e toda sua equipe pela atenção dedicada, à Anvisa, ao ISC/UFBA pela oportunidade do aprendizado e aos meus queridos colegas da GPBEN/ANVISA pelas angústias e alegrias compartilhadas no dia a dia.

**Resumo:** O processo de pesquisa e desenvolvimento é fundamental para a obtenção de medicamentos seguros e eficazes. Isso traz à Vigilância Sanitária uma responsabilidade significativa no controle desse processo já que a ela compete a eliminação, diminuição ou prevenção de riscos à saúde. Esta dissertação teve como objetivo a proposição de um guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos. As informações obtidas na etapa não clínica darão subsídios às Pesquisas Clínicas podendo minimizar os riscos da exposição da droga a humanos. Os antineoplásicos foram escolhidos devido à importância epidemiológica das neoplasias e a toxicidade inerente a esses produtos. O guia foi criado baseando-se em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMEA), instituições de harmonização (ICH, OECD) e de interesse na área (NCI, WHO). Realizou-se também uma análise das recomendações das regulações nacionais que tratavam do assunto. O guia teve um aspecto operacional citando, por exemplo, os estudos que devem ser realizados, a espécie animal indicada, em que fase da Pesquisa Clínica deverão estar finalizados. Pôde-se perceber certa harmonização dos guias internacionais e evidente preocupação com a avaliação risco-benefício para o desenvolvimento dos antineoplásicos.

**Palavras-Chave:** Estudos Não Clínicos de Segurança; Estudos Pré-Clínicos; Medicamentos Antineoplásicos; Pesquisa Clínica; Pesquisa e Desenvolvimento; Vigilância Sanitária.

**Abstract:** The research and development process is essential to obtain safe and effective drugs. Thus, Health Surveillance, in this field of elimination, reduction and prevention of risks, has an important responsibility in controlling this process. This dissertation is aimed at presenting a proposal of a guide for performing safety non-clinical trials for the development of anticancer drugs. The information of the non-clinical stage will subsidize the Clinical Trials so as to minimize the risks of human beings exposure to these drugs. Anticancer drugs have been chosen because of the epidemiological relevance of cancer and the inherent toxicity of these products. The guide was based on documents from recognized health surveillance agencies (FDA, EMEA), harmonization institutions (ICH, OECD) and other institutions in this field (NCI, WHO). An analysis of recommendations of related national regulations was also made. The guide is operational, since it quotes, for example, trials that must be performed, recommended animal species, and in which phase of the Clinical Trials these studies must be concluded. The international guidelines are in relative harmony with one another and there is an evident concern with the evaluation of risk-benefit in the development of anticancer drugs.

**Key-Words:** Non-Clinical Safety Study; Pre Clinical Study; Anticancer Drugs; Clinical Trials; Research and Development; Sanitary Surveillance.

## LISTA DE SIGLAS:

ADME: Administração, Distribuição, Metabolismo, Excreção  
(Toxicocinética/Farmacocinética)  
AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
ALT: Alanina Aminotransferase (Bioquímica)  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AST: Aspartato Aminotransferase (Bioquímica)  
AUC: Área sob a curva tempo x concentração de zero até o tempo T  
(Toxicocinética/Farmacocinética)  
BPL: Boas Práticas de Laboratório  
CE: Comunicado Especial  
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa  
CEPEC: Coordenação de Pesquisas e Ensaio Clínicos  
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (Hemograma)  
CNS: Conselho Nacional de Saúde  
CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa  
COMSI: Coordenação de Medicamentos Sintéticos e Semi-Sintéticos  
CPBIH: Coordenação de Produtos Biológicos e Hemoterápicos  
DL50: Dose Letal Mediana  
EMEA: European Medicines Agency – Agência Europeia de Medicamentos (Europa)  
FDA: Food and Drug Administration – Administração de Alimentos e Drogas (EUA)  
GGIMP: Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Insumos, Medicamentos e Produtos  
GGT: Gama Glutamil Transferase (Bioquímica)  
GPBEN: Gerência de Pesquisas, Ensaio Clínicos, Medicamentos Biológicos e Novos  
HCM: Hemoglobina Corpuscular Média (Hemograma)  
ICH: International Conference on Harmonisation – Conferência Internacional de Harmonização  
INCA: Instituto Nacional do Câncer – (BRA)  
IND: Investigational New Drug (EUA)  
LDH: Lactato Desidrogenase (Bioquímica)  
MTD: Máxima Dose Tolerada  
NCI: National Cancer Institute (EUA)  
NDA: New Drug Application (EUA)  
NIH: National Institutes of Health – Instituto Nacional de Saúde (EUA)  
NOEL: Non Observed Effect Level - Nível de Efeito Não Observável (Toxicologia)  
OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development – Organização para cooperação e desenvolvimento econômico  
P & D: Pesquisa e Desenvolvimento  
RCBP: Registros de Câncer de Base Populacional  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada (Anvisa)  
SIM: Sistema de Informação sobre Mortalidade  
UFARM: Unidade de Farmacovigilância  
VCM: Volume Corpuscular Médio (Hemograma)  
WHO: World Health Organization – Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1- INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2- METODOLOGIA.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>3- REVISÃO.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3-1 – Medicamentos Antineoplásicos.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3-2 – Pesquisa e Desenvolvimento.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3-3 – Estudos Não Clínicos de Segurança.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>3-4 - Estudos de Toxicidade de Dose Única (Aguda).....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3-5 - Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3-6 - Estudos de Reprodutividade.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3-7 – Estudos de Genotoxicidade.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3-8- Estudos de Tolerância Local.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>3-9 – Estudos de Carcinogenicidade.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>3-10 – Estudos de interesse para a avaliação da Segurança Farmacológica...54</b>                      |           |
| <b>3-11 – Estudos de Toxicocinética.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>4- RESULTADO.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>5- CONSIDERAÇÕES.....</b>   | <b>82</b> |
| <b>5-1 - Considerações para a condução de estudos de Toxicidade de Dose Única (aguda) no Brasil.....</b> | <b>82</b> |
| <b>5-2 - Considerações para a condução de estudos de Toxicidade de Doses Repetidas no Brasil.....</b>    | <b>83</b> |
| <b>5-3 - Considerações para a condução de estudos de toxicidade reprodutiva no Brasil.....</b>           | <b>83</b> |
| <b>5-4 - Considerações para a condução de estudos de Genotoxicidade no Brasil.....</b>                   | <b>84</b> |
| <b>5-5 - Considerações para a condução de estudos de Tolerância Local no Brasil.....</b>                 | <b>85</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5-6 - Considerações para a condução de estudos de Carcinogenicidade no Brasil.....</b>                                     | <b>85</b>  |
| <b>5-7 - Considerações para a condução de estudos de interesse para a avaliação da Segurança Farmacológica no Brasil.....</b> | <b>86</b>  |
| <b>5-8 - Considerações para a condução de estudos de Toxicocinética no Brasil.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>5-9 - Considerações Finais.....</b>  | <b>87</b>  |
| <br>  |            |
| <b>6- RECOMENDAÇÕES À INSTITUIÇÃO (ANVISA).....</b>   | <b>89</b>  |
| <br>  |            |
| <b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>90</b>  |
| <br>  |            |
| <b>8- ANEXOS.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>8-1 –Como encontrar e obter os guias referenciados.....</b>  | <b>101</b> |
| <b>8-2 –Quadro comparativo das regulações de abrangência nacional.....</b>  | <b>106</b> |
| <b>8-3 –Quadro das classificações de medicamentos antineoplásicos.....</b>  | <b>108</b> |



## 1- INTRODUÇÃO

É possível constatar que o mercado farmacêutico traz constantemente novas drogas que se incorporam cada vez mais ao nosso cotidiano. Acredita-se que esses novos produtos vêm, muitas vezes, melhorando a sobrevivência de pacientes, aumentando as expectativas de vida da população, tornando mais acessíveis a administração de fármacos e esquemas posológicos, além de outras vantagens. Mas, juntamente às novas tecnologias, estão inseridos riscos que são atribuídos a processos de produção, ou muitas vezes, inerentes aos próprios produtos (LUCCHESI, 2001).

A Lei Orgânica da Saúde (BRASIL, 1990) define vigilância sanitária como “...um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde [...]”. Além do fator risco, as noções de qualidade, eficácia e segurança constituem categorias operacionais nas ações de proteção à saúde (COSTA, 2003). Isso confere à Vigilância Sanitária uma grande responsabilidade na avaliação de riscos, sendo necessárias ações como fiscalização, regulação, entre outras. Torna-se também cada vez mais importante o conhecimento e controle de toda cadeia do processo produtivo dos medicamentos.

A pesquisa e desenvolvimento de medicamentos podem ser entendidos, de maneira simplificada, como o descobrimento e síntese da molécula, alterações de sua estrutura para a melhoria de seu potencial, testes de eficácia e segurança *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (animais), para posteriores estudos em humanos (Pesquisa Clínica). Após a comercialização de o medicamento ter sido autorizada por instituições reguladoras dos países, podem ainda ocorrer estudos de monitoramento no mercado (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004).

Pode-se dizer que atualmente o processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos tem o seu controle mais especificamente baseado na autorização de realização de Pesquisas Clínicas no país, na concessão do registro, nas inspeções de Boas Práticas de Fabricação e na Farmacovigilância. No Brasil, essas tecnologias de intervenção competem à Vigilância Sanitária (à exceção da Pesquisa Clínica que compete também ao Sistema CEPs - CONEP).

A Gerência de Pesquisas, Ensaios Clínicos, Medicamentos Biológicos e Novos - GPBEN é a gerência da Anvisa a qual compete a autorização das Pesquisas Clínicas em território nacional e o registro de medicamentos novos (sintéticos, semi-sintéticos e biológicos). Já as inspeções de Boas Práticas de Fabricação competem à Gerência-Geral de

Inspeção e Controle de Insumos, Medicamentos e Produtos - GGIMP. As notificações de reações adversas de medicamentos são acompanhadas e avaliadas pela Unidade de Farmacovigilância - UFARM.

O Sistema CEPs - CONEP é formado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP's) coordenado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Esse sistema tem como um de seus objetivos a apreciação de projetos de pesquisas envolvendo seres humanos zelando pela proteção dos sujeitos de pesquisa. Sendo assim, juntamente com a Anvisa esse Sistema é responsável pela avaliação de Pesquisas Clínicas no Brasil (FREITAS, 2006). Segundo Nishioka (2006), o processo de aprovação da Pesquisa Clínica no país é sujeito a críticas, pois o fato da avaliação ocorrer por várias entidades traz certa morosidade ao processo o que pode diminuir a competitividade do país no caso de estudos multicêntricos internacionais.

Pode-se constatar que há um controle da Anvisa sobre a etapa clínica (Pesquisa Clínica) do desenvolvimento de medicamentos no país, mas ainda há uma atuação muito tímida sobre o controle dos estudos não clínicos. Considerando a lacuna existente na regulação de estudos não clínicos no país e a sua importância para garantir a segurança dos fármacos, identificando os seus riscos, é muito importante que a Anvisa atue de forma mais efetiva na regulação dessa fase de desenvolvimento dos medicamentos.

Devido à necessidade da delimitação da pesquisa a ser realizada, o objetivo principal do trabalho desenvolvido é a elaboração de um guia visando a orientação de empresas/pesquisadores sobre como realizar estudos não clínicos de segurança, durante o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos. O documento foi construído a partir de regulamentos e guias dos principais países e instituições com notória experiência na área de medicamentos e/ou na área oncológica, tentando viabilizar e adaptar esses princípios à realidade brasileira. Como objetivos específicos, a dissertação almejou definir critérios mínimos a serem seguidos na realização de estudos não clínicos de segurança, para o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos, além de detectar e comparar as regulações de abrangência nacional quanto à citação/descrição desses estudos.

Para fins de regulação no país, não há como desconsiderarmos a questão da globalização. Atualmente, os países buscam harmonizar regulamentos econômicos, financeiros e também sanitários. A realidade atual exige uma intervenção estatal de novo tipo, mais efetiva e eficiente diante dos riscos e ameaças que também se globalizam de maneira acelerada (LUCCHESI, 2003). Isto nos evidencia a necessidade da criação de regulações baseadas no conhecimento de ações internacionais. Algumas vezes, pode ser possível

internacionalizar essas ações, outras vezes não é possível “destruir as barreiras” do Estado. Muitas vezes as particularidades de cada país impedem que sejam tomadas ações globalizadas, por isso acredita-se que é muito importante o conhecimento das reais necessidades do Estado antes do processo de globalização.

A escolha dos medicamentos antineoplásicos baseou-se na importância epidemiológica do câncer, e no risco toxicológico inerente a essa classe terapêutica.

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública. Segundo dados da WHO, mais de 11 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas anualmente com algum tipo de neoplasia. A doença é responsável por sete milhões de óbitos por ano o que corresponde a 12,5% de causa de mortalidade no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, [200-]).

No Brasil, as neoplasias ocupam o segundo lugar (15,50 %) como causa de mortalidade perdendo apenas para doenças do aparelho circulatório (31,54%), conforme dados do Datasus referentes a 2003 (BRASIL, 2005). O país não possui um sistema de registros de casos novos de câncer de abrangência nacional o que dificulta a análise da incidência da doença, mas, o Instituto Nacional do Câncer - INCA, vem calculando a estimativa anual da doença baseada nas taxas de mortalidade obtidas do SIM<sup>1</sup> e nos RCBP<sup>2</sup>. O instituto estimou para 2006 a ocorrência de 472050 casos novos de câncer no país (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2005).

Dessa forma, com o desenvolvimento do guia pretende-se assegurar a finalidade institucional da Anvisa no que tange aos aspectos da proteção à saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos, inclusive dos processos e das tecnologias a eles relacionados (BRASIL, 1999). Almeja-se assim, um maior controle do processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos visando garantir aos usuários, o acesso a produtos, com riscos melhor calculados e identificados.

---

<sup>1</sup> SIM – O Sistema de Informação sobre Mortalidade possui abrangência nacional desde 1979 e utiliza como dados – a Declaração de Óbitos. Contém informações sobre as características de pessoa, tempo e lugar, condições de óbito, inclusive sobre a assistência prestada ao paciente, causas básicas e associadas. (MOTA, 2003).

<sup>2</sup> RCBP – Registro de Câncer de Base Populacional contém informações sobre morbi-mortalidade por câncer, mostrando a incidência da doença dentro de uma população controlada (contabiliza pessoas com câncer residentes, há mais de cinco anos, na área geográfica analisada). Os dados são coletados por meio de busca ativa em laboratórios, casas de saúde e hospitais (BRASIL, s.d.).

## 2- METODOLOGIA

O propósito da dissertação apresentada foi a elaboração de um guia que contemplasse as principais orientações para a realização de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos.

Para a revisão dos estudos não clínicos de segurança e conseqüente elaboração do guia foi realizada uma pesquisa documental baseada em consultas a guias de diversas instituições. Foram reconhecidas como agências para consulta, a FDA e a EMEA. Também foram consultados guias de instituições de harmonização (no caso, ICH e OECD) e de notório interesse na área (NCI e WHO). Visando a complementaridade das informações foram consultados artigos e livros específicos sobre toxicologia.

A EMEA e a FDA foram selecionadas para consulta devido à notória experiência internacional na área de regulação e vigilância sanitária de medicamentos. A FDA, desde o começo do século passado, é responsável pelo controle de alimentos e drogas no território americano (SWANN, 1998). A EMEA apesar de ter menos tempo de ação nessa estrutura que atualmente está organizada (desde 1995), é responsável pela proteção e promoção da saúde pública e animal na União Européia (composta por vinte e cinco países membros) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA, 2006b).

A seleção das instituições de harmonização ocorreu devido ao fato de seus guias serem reconhecidos, introduzidos e referenciados por agências reguladoras de vários países (como Canadá, Austrália, Estados Unidos, União Européia). A ICH, que é uma conferência de harmonização agências reguladoras e indústrias dos Estados Unidos, Europa e Japão, discute científica e tecnicamente procedimentos necessários à avaliação da segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, [199-]). A OECD é um grupo composto por trinta países membros que produz acordos, decisões e recomendações internacionais em áreas onde acordos multilaterais são necessários para que países, na esfera individual, possam contribuir para a progressão da economia globalizada (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, [2006?]).

Em relação à busca de guias da WHO e do NCI, conforme anteriormente informado, pode-se dizer que a seleção dessas duas entidades se deve ao interesse na área pesquisada. A WHO foi criada em 1948 com o objetivo de que todos os povos pudessem alcançar o grau máximo de saúde que fosse possível (WHO, s.d.). Para cumprir o seu objetivo, a WHO possui

várias publicações, instruções, recomendações inclusive para a P & D de medicamentos. O NCI pertence ao NIH, que compõe o Serviço Público de Saúde Norte Americano. Essa instituição tem vários objetivos voltados ao controle, educação e pesquisas na área do câncer possuindo também, guias específicos para o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos (NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI, s.d.).

Para a obtenção dos guias da FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, s.d.) foi consultado o sítio oficial da agência e procurado material específico por palavras chave referentes aos testes como: *carcinogenicity guideline*, *toxicity guideline*, *non clinical safety*, *safety pharmacology guideline*, etc. Os guias da EMEA foram obtidos acessando o sítio oficial da agência mediante o seguinte caminho: na página principal do sítio foi acessado o item “*Human Medicines*”. Após esse acesso, abriu-se nova página e foi consultado o subitem “Non Clinical” disposto dentro do item “*Human Guidelines*” (SCIENTIFIC GUIDELINES FOR HUMAN MEDICINAL PRODUCTS, s.d.).

No caso dos guias da ICH, foi consultado o sítio oficial da instituição (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, s.d.). No sítio há guias relativos a avaliações da segurança, qualidade e eficácia necessárias ao desenvolvimento de medicamentos. Na página principal, a partir do acesso ao item *Safety* foram obtidos os guias específicos para os estudos não clínicos relativos à segurança.

Os guias da OECD poderiam ser obtidos pelo seu sítio oficial mediante compra (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD, s.d.). Devido ao custo embutido para obtenção desses guias, as informações referentes a esses materiais foram obtidas de fontes secundárias. Procurou-se obter informações secundárias de citações contidas em fontes consideradas confiáveis como artigos e sítios oficiais de agências reguladoras de medicamentos (no caso, *Health Canada*, FDA).

Pela consulta ao sítio oficial da WHO foi obtido o *HANDBOOK - Non Clinical Safety Testing* (WHO, 2004) que serviu como base para consultas referentes aos testes de segurança. O livro trata das diretrizes a serem seguidas na condução de estudos não clínicos relativos à segurança.

A obtenção dos guias do NCI ocorreu mediante solicitação via e-mail à instituição, uma vez que no sítio oficial há uma listagem dos guias existentes, mas, não há a disponibilização dos mesmos (PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY RESOURCES, s.d.).

Visando facilitar a consulta e obtenção pelos leitores de guias referenciados, foi construído um quadro que contém o nome e instituição dos guias de cada estudo proposto, além da maneira de obtê-los (Anexo 7-1).

Também foram consultadas as regulações de abrangência nacional que se referiam aos estudos não clínicos. Baseado nessa pesquisa analisou-se as divergências e concordâncias com as diretrizes internacionais consultadas. Para melhor visualização dos aspectos abordados nas regulações, foi construído também um quadro contendo as regulações consultadas e as recomendações ou citações para cada estudo específico que nelas estavam contidas (Anexo 7-2). As regulações de abrangência nacional consultadas foram: as Resoluções nº 01/88 (BRASIL, 1988) e 251/97 (BRASIL, 1997) do Conselho Nacional de Saúde, a RDC 219/04 (BRASIL, 2004a) e RE nº 90/04 (BRASIL, 2004b) da Anvisa e a Resolução 129/96 (MERCADO COMUM DO SUL – MERCOSUL, 1996) do Mercosul.

A Resolução nº 01/88 aprovava normas de pesquisas em saúde. Essa regulação teve uma importância histórica por ter sido pioneira na regulação de pesquisa clínica no país, mas teve impacto prático muito pequeno para o controle desses estudos no Brasil (NISHIOKA & SÁ, 2006). Conforme consulta realizada, foi também a primeira regulação no país a abordar aspectos da pesquisa pré-clínica. Este regulamento foi revogado pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996).

Em 1997 foi publicada a Resolução nº 251/97 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1997). Essa resolução, que ainda está em vigor, apresenta normas para pesquisa envolvendo seres humanos com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. Nesta resolução estão relacionadas informações referentes à toxicologia pré-clínica que deverão estar contidas no Protocolo de Pesquisa Clínica.

A Anvisa possui as Resoluções RDC 219/04 (BRASIL, 2004a) e RE 90/04 (BRASIL, 2004b). A RDC nº 219/04 aprova o regulamento para elaboração de dossiê para a obtenção de comunicado especial (CE) para a realização de pesquisa clínica com medicamentos e produtos para a saúde. Esta resolução considera que o documento “Brochura do Investigador”<sup>3</sup> deve conter informações sobre os estudos não clínicos do produto sob investigação. Já a RE 90/04, foi a única regulação de abrangência nacional consultada que trata especificamente de estudos de toxicidade pré-clínica. Porém, a sua abrangência se resume a medicamentos fitoterápicos.

---

<sup>3</sup> Conforme RDC 219/04 (BRASIL, 2004a), Brochura do Investigador seria o documento do dossiê de Pesquisa Clínica que apresenta compilações de dados clínicos e não clínicos sobre o(s) produto(s) sob investigação, que tenham relevância para o seu estudo em seres humanos.

A Resolução 129/96 (MERCOSUL, 1996) compreende o regulamento técnico sobre a verificação de Boas Práticas de Pesquisa Clínica possuindo um capítulo dedicado à informação pré-clínica (capítulo X). Esta regulação abrange todos os países membros do Mercosul (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai).

Após cuidadosa revisão de guias, artigos e livros referentes a cada estudo não clínico de segurança, teceram-se considerações específicas aos assuntos e foram discutidas as posições adotadas pelas diversas entidades consultadas, principalmente em casos de divergência. A partir dessas análises, construiu-se o guia apresentado neste trabalho.

O propósito da pesquisa realizada foi a elaboração de um guia. Esse documento proposto visa recomendar um caminho para a realização de estudos e não limitar empresas/pesquisadores de encontrarem outros meios técnica e cientificamente reconhecidos para comprovarem a segurança e eficácia dos medicamentos. Acredita-se que a regulação pelo seu caráter deliberativo possa impedir a criatividade e desenvolvimento de novas metodologias viáveis para o desenvolvimento de estudos não clínicos de segurança e que o guia tenha um caráter apenas orientador para a condução dessas pesquisas.

O guia elaborado buscou estabelecer diretrizes para a realização dos estudos não clínicos de segurança e eventualmente apresentar alguns aspectos importantes da metodologia, mas não evidenciar um detalhamento do desenho experimental de cada teste indicado. Portanto, o guia cita os estudos que devem ser realizados, a espécie animal mais indicada, a quantidade de animais a ser utilizada, a duração dos testes e em que fase da Pesquisa Clínica determinados estudos deverão estar finalizados.

Para um melhor entendimento do assunto e de sua relevância para a Anvisa, foram realizadas também revisões a respeito dos medicamentos antineoplásicos e do processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

### 3- REVISÃO

#### 3-1- Medicamentos Antineoplásicos

O câncer é basicamente uma doença de células, caracterizada por um desvio nos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação celular. As células neoplásicas proliferam excessivamente e formam tumores que podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes normais. Os processos invasivos e metastáticos<sup>4</sup>, bem com uma série de anormalidades metabólicas decorrentes do câncer, provocam doenças e eventual morte do indivíduo, exceto em casos em que a neoplasia pode ser erradicada e controlada por tratamento (SALMON & SARTORELLI, 2004).

A primeira meta do tratamento para câncer é a erradicação da doença. Caso a primeira meta não seja possível, a meta passa a ser a melhoria dos sintomas, a preservação da qualidade de vida com o aumento da sobrevida. Atualmente, há várias modalidades de tratamento que de maneira isolada ou conjunta, maximizam a chance de cura ou controle da doença. Essas modalidades de tratamento são: cirurgia, terapia radioativa, quimioterapia e terapia biológica - imunoterapia e terapia genética (SAUSVILLE & LONGO, 2004). Isto nos faz perceber a importância dos medicamentos antineoplásicos no auxílio à cura ou melhoria de vida de pacientes acometidos por neoplasias.

Para Sausville & Longo (2004), medicamentos antineoplásicos oferecem tratamentos direcionados a pacientes com câncer e os trata em conjunto com cirurgias e radioterapias. O objetivo central desses medicamentos é ter um efeito benéfico na história natural da doença ou influenciar favoravelmente na qualidade de vida dos pacientes vítimas de neoplasias.

As primeiras observações de regressão tumoral induzida por fármacos datam do início da década de 1940 e foram feitas com as mostardas nitrogenadas. Com o passar do tempo, novos fármacos quimioterápicos foram adicionadas ao arsenal da terapia antineoplásica. Apesar de maior atividade antitumoral e menor toxicidade, o fundamento racional da ação dessas novas moléculas estava baseado em conceitos relativamente antigos do ciclo celular. A ação se caracterizava por interromper ou conturbar etapas importantes de proliferação celular, levando as células em fase de duplicação à morte. Atualmente uma nova geração de fármacos tem-se desenvolvido rapidamente. Esses agentes, atuando ao nível de membrana celular ou no ambiente intracelular, induzem a morte da célula neoplásica com pouco ou nenhum efeito deletério sobre outras células. Fazem parte dessa nova classe, fármacos como anticorpos

---

<sup>4</sup> Metástase, segundo Salmon & Sartorelli (2004) seria o processo de migração de células neoplásicas para locais distantes do corpo a fim de colonizar vários órgãos.



monoclonais, inibidores da enzima tirosino-quinase, entre muitos outros (SAMPAIO FILHO C.; et al., 2006). Para que se possa ter uma noção do mecanismo de ação de medicamentos antineoplásicos, encontra-se anexo um quadro que foi elaborado para evidenciar de maneira esquemática as principais classes de medicamentos antineoplásicos (Anexo 7-3).

Segundo Salmon & Sartorelli (2004), os fármacos ideais contra o câncer deveriam erradicar as células cancerosas sem prejudicar os tecidos normais. Infelizmente, para os autores, não existem atualmente agentes que satisfaçam este critério, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade na procura de um índice terapêutico favorável. Portanto, pode-se perceber que para a autorização da comercialização de medicamentos antineoplásicos as agências reguladoras devem levar em conta além da avaliação de eficácia e segurança, também, a ponderação do risco *versus* benefício que a disponibilidade ou não do medicamento possa trazer a pacientes.

Conforme consulta realizada a especialistas da CEPEC/GPBEN/ANVISA (SCARIOT & BARBOSA, dados não publicados), pôde-se constatar que no ano de 2005 foram autorizadas 38 pesquisas com antineoplásicos pela gerência, sendo nesse ano a classe terapêutica mais pesquisada (18,8% das pesquisas autorizadas). Até Novembro do ano seguinte foram constatadas 42 pesquisas em andamento no Brasil com medicamentos antineoplásicos.

Mediante consultas a especialistas da COMSI/GPBEN/ANVISA (LEITE & SANTOS, dados não publicados), pôde-se obter dados referentes ao registro de novos medicamentos antineoplásicos. De acordo com essa coordenação, foram registrados no Brasil cinco novos medicamentos antineoplásicos (Exemestano, Imatinibe, Gentuzumabe Ozogamicina, Fulvestranto e por último, Bortezomide), nos últimos cinco anos. Além desses medicamentos, também foi registrado o Ácido Zoledrônico que, apesar de não ter uma atividade antineoplásica direta, é indicado para pacientes acometidos por metástase óssea por inibir a reabsorção óssea osteoclástica. A análise do número de medicamentos antineoplásicos registrados no país pode ter sido limitada, uma vez que não foi possível a obtenção de dados de registros referentes a produtos biológicos antineoplásicos da CPBIH/GPBEN/ANVISA (dessa forma, pode ter sido desconsiderado, por exemplo, o registro de algum anticorpo monoclonal).

Diante das particularidades dessa classe terapêutica, número de pesquisas realizadas no país, possível número crescente de medicamentos sendo desenvolvidos e conseqüentemente disponibilizados à população a cada momento, constata-se a importância da criação de mecanismos reguladores para o controle do desenvolvimento desses fármacos.

Espera-se que tais mecanismos possam auxiliar o desenvolvimento de produtos que, se não curem as enfermidades, ao menos possam melhorar a sobrevida sem acarretar maiores prejuízos às pessoas que os utilizarão.

### **3-2- Pesquisa e Desenvolvimento**

O desenvolvimento de medicamentos no início do século XX era bastante tímido se comparado aos dias atuais. Além disso, poucos eram os agentes terapêuticos realmente ativos à disposição da medicina naqueles anos e a sua utilização era, muitas vezes, baseada no feliz acaso ou na observação casual. A maioria dos fármacos então utilizados, sob a ótica atual, eram totalmente ineficazes (PAULO & AMARAL, 2006).

Acredita-se que tragédias medicamentosas têm desencadeado grandes mudanças nos regulamentos e controles mundiais a respeito da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Como exemplo disso, podemos considerar o fato de em 1938, o congresso americano ter aprovado o Federal Food, Drug, and Cosmetic (FDC) Act que declarava, entre outras coisas, que o fabricante deveria provar à FDA que a droga era segura antes dela ser aprovada para comercialização. Essa regulação foi uma resposta ao incidente com o “Elixir” de Sulfanilamida que devido ao excipiente nefrotóxico (dietilenoglicol) foi responsável pela morte de várias pessoas (OLIVEIRA, et al, 2006).

Por volta de 1940, durante a segunda guerra mundial, segundo Modell *apud* Paulo & Amaral (2006), houve a “explosão dos fármacos” caracterizada pela pesquisa e desenvolvimento de potentes fármacos de forma mais científica e racional, em contraposição ao casualismo de décadas anteriores.

Apesar da existência de regulações mais rígidas internacionalmente para o desenvolvimento de novos fármacos, no início da década de 60, a talidomida foi retirada do mercado por estar associada ao aumento do número de casos de malformações fetais, mais especificamente, focomelia<sup>5</sup> (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004).

Em 1962, com a tragédia da talidomida, a FDA passou a requerer (Kefauver-Harris Drug Amendments – Ato Federal) que indústrias farmacêuticas submetessem evidências não só de segurança, mas também de eficácia. A FDA deveria ser notificada antes que as empresas realizassem estudos em humanos e esses estudos só poderiam ser iniciados quando a empresa obtivesse a IND ou a sua dispensa pela agência (SWANN, 1998). A Comunidade Européia, em 1965, publicou uma diretiva (65/65/EEC) a partir da qual, medicamentos não

---

<sup>5</sup> Focomelia, segundo Descritores em Ciências da Saúde (BIREME, 2006), seria aplasia ou hipoplasia grosseira de um ou mais ossos longos de um ou mais membros.

deveriam ser dispostos ao mercado antes da publicação de autorização pela autoridade competente dos estados membros (THE COUNCIL OF THE EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY, 1965).

Com o auxílio ou não de regulações mais criteriosas, pôde ser observada, no decorrer dos anos, uma evidente progressão nos processos de P & D de novos medicamentos. Apesar de toda a regulamentação e controle mundial, ocorreu em 2006, um acidente com um estudo de Fase 1, no Reino Unido. O estudo envolvia um medicamento (TGN 1412 – um anticorpo monoclonal) que estava sendo desenvolvido para o tratamento de doenças como leucemia linfocítica crônica e artrite reumatóide. A Pesquisa Clínica foi suspensa depois que todos os seis voluntários saudáveis que receberam o fármaco foram internados para cuidados intensivos (GOODYEAR, 2006). O acidente ocorrido nos leva a questionar se os estudos realizados com medicamentos, anteriormente à administração em humanos, estão sendo suficientes ou adequadamente planejados.

A P & D de novos medicamentos inicia-se pelo descobrimento ou síntese de um fármaco em potencial e na avaliação de sua ação no alvo biológico apropriado. Após essa fase, o fármaco a ser pesquisado pode sofrer alterações visando acréscimos em seu potencial e em sua seletividade. Na etapa seguinte, serão realizados testes de eficácia e segurança em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (animais) para que posteriormente os fármacos possam ser testados em humanos (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004)

Segundo Berkowitz & Katzung (2004), na fase de descobrimento, os fármacos candidatos são criados com base nos seguintes propósitos: identificação ou elucidação de uma nova droga alvo, desenho racional baseado no entendimento de mecanismos biológicos, estrutura do receptor do fármaco, modificações químicas de uma molécula conhecida, seleção de atividades biológicas de grande número de produtos naturais, biotecnologia e utilização de clones para produzir grandes peptídeos e proteínas.

Conforme já relatado anteriormente, com a droga selecionada (“*drug screening*”) será realizada uma variedade de ensaios moleculares, celulares, em órgãos e em animais para definir sua atividade e seletividade. Os estudos realizados durante essa fase permitem caracterizar o Perfil Farmacológico. Caso os fármacos candidatos sobrevivam a essa fase de triagem e de avaliação do perfil farmacológico eles serão então ensaiados quanto a sua segurança antes e durante a Pesquisa Clínica (estudos não clínicos de segurança serão mais bem detalhados no próximo item) (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004).

A última etapa da P& D de medicamentos é realizada em humanos. Pode-se perceber que o fármaco é estudado clinicamente (ou pelo menos deveria ser) após a obtenção de dados de segurança e eficácia obtidos *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*.

A avaliação em humanos reconhecida como Pesquisa Clínica, Ensaio Clínico, *Clinical Trial* é composta de quatro fases que podem assim ser definidas (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004; BRASIL, 1997; OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2006):

Fase 1: Essa fase tem como objetivo determinar a segurança do medicamento num número necessariamente reduzido de voluntários geralmente saudáveis (em casos de fármacos com acentuada toxicidade, normalmente utilizados em terapias de doenças graves, como as neoplasias, AIDS, pacientes voluntários acometidos da patologia participam da Fase 1 em preferência a voluntários sadios). Apesar de a molécula ter sido aprovada nos testes pré-clínicos, os pesquisadores devem proceder, nos testes clínicos, com extrema cautela, pois a extrapolação dos dados obtidos em animais para humanos ainda é cercada de incertezas. Portanto, a Fase 1 pode indicar se humanos e animais apresentam respostas significativamente diferentes.

Fase 2: Essa fase objetiva, essencialmente, estabelecer o nível de eficácia do novo fármaco para o controle e ou tratamento do quadro clínico da enfermidade a ser estudada. Trata-se de uma fase crítica pelo fato de que, na maioria dos casos, pela primeira vez doentes serão expostos ao fármaco em desenvolvimento. Esta fase visa também estabelecer a segurança a curto prazo do princípio ativo. Pode ser dividida em 2a (quando os ensaios são curtos, durando menos de duas semanas) ou 2b (quando são mais longos que duas semanas). Nessa fase podem ser alocados um número maior de pacientes do que na Fase 1, mas ainda é um número limitado (cem a trezentos pacientes)

Fase 3: Essa fase tem como característica o aprofundamento dos conhecimentos de segurança e eficácia obtidos nos estudos anteriores, utilizando, para isso, um número maior de pacientes e por períodos mais longos (algumas vezes são alocados milhares de pacientes). Além disso, são realizadas também pesquisas sobre a farmacodinâmica, farmacotécnica, interações medicamentosas, alimentares, de doenças concomitantes e avaliações de eventos adversos. Pode ser dividida em 3a (estudos básicos para o estabelecimento do perfil de eficácia e segurança) e 3b (estudos complementares).

Fase 4: Os estudos realizados nessa fase ocorrem após a liberação da comercialização do medicamento. Relacionam-se com o aprofundamento dos mecanismos farmacodinâmicos e farmacocinéticos. Além disso, buscam novas indicações terapêuticas e investigam o aparecimento de novas reações adversas medicamentosas. A investigação de novas reações



mesmo antes da finalização da Fase 2 (Mecanismo *Fast Track*). (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004).

A Anvisa não possui processos de aprovação acelerada de medicamentos (Mecanismos *Fast Track*) como a FDA. A legislação brasileira não prevê a existência de registros acelerados: o registro é ou não concedido mediante informações conclusivas de segurança e eficácia obtidas em todas as fases de pesquisas clínicas anteriores à comercialização (inclusive Fase 3). Acredita-se que o processo de aprovação acelerada requer um acompanhamento mais efetivo das Agências, uma vez que são condicionados à apresentação de evidências sugestivas de eficácia e segurança, as quais são obtidas em grande parte por ensaios clínicos ainda em andamento (GERÊNCIA DE MEDICAMENTOS NOVOS, PESQUISA E ENSAIOS CLÍNICOS - GEPEC, 2004).

Para se obter a aprovação para a comercialização de medicamentos na EMEA deve ser encaminhada a solicitação de registro de produtos novos para a Agência Européia que avaliará a solicitação baseada nos critérios de segurança, qualidade e eficácia. Caso seja concedida autorização para a comercialização, a mesma será válida para todos os estados membros pertencentes à União Européia (THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL, 2004).

No Brasil, a realização da Pesquisa Clínica se inicia com a autorização de duas instâncias reguladoras: Anvisa por meio da CEPEC/GPBEN e o Sistema CEP/CONEP. A Anvisa possui uma avaliação de cunho mais metodológico e sanitário e o Sistema CEP/CONEP mais ético (NISHIOKA & SÁ, 2006).

A autorização da realização das Pesquisas Clínicas pela Anvisa, ocorre mediante a análise de documentação solicitada pela RDC 219/04 e posterior liberação do CE<sup>6</sup>. Conforme RDC 219/04 são analisados uma série de documentos dos quais pode-se destacar: Brochura do Investigador (no qual são apresentadas informações sobre os estudos não clínicos e clínicos que já foram realizados com a droga), Protocolo Clínico (que descreve a pesquisa a ser realizada com seus aspectos fundamentais) e dados sobre o investigador principal e demais investigadores participantes da Pesquisa (*curriculum vitae*) (BRASIL, 2004a).

A autorização para realização de estudos envolvendo seres humanos pelos CEPs e, quando for o caso, pela CONEP se dá mediante a observação de uma série de resoluções das

---

<sup>6</sup> De acordo com a RDC 219/04 (BRASIL, 2004a), o CE (Comunicado Especial) é um documento de caráter autorizador emitido pela GPBEN, que permite a execução do protocolo de Pesquisa Clínica, em um determinado Centro de Pesquisa, e, quando for o caso, a importação do(s) produto(s) envolvido(s) no protocolo.

quais podemos destacar a Resolução 196/96 (BRASIL, 1996) e a Resolução 251/97 (BRASIL, 1997).

Conforme a Lei 6360/76 (BRASIL, 1976), no Brasil, nenhum medicamento pode ser industrializado, exposto à venda ou entregue ao consumo antes de ser registrado no Ministério da Saúde. Para o registro de medicamentos é necessário (entre outros requisitos) que o produto, através de comprovação científica e de análise, seja reconhecido como seguro e eficaz para o uso a que se propõe, e que possua identidade, atividade, qualidade, pureza e inocuidade necessárias.

O registro de medicamentos novos sintéticos ou semi-sintéticos, atualmente, é concedido pela COMSI/GPBEN/ANVISA mediante observação dos parâmetros contidos na RDC 136/2003 (BRASIL, 2003), avaliando principalmente as informações fornecidas pelas empresas sobre os estudos de farmacotécnica, segurança e eficácia realizados com o fármaco candidato. Os estudos clínicos avaliados para concessão de registro não precisam ser realizados necessariamente com a população brasileira. Porém, a postura adotada pela Anvisa tem revelado preocupação e incentivo à realização de Pesquisas Clínicas (confiáveis e de qualidade) em nosso país.

Mediante a exposição do processo de P & D é possível perceber a importância do papel regulador da Anvisa não só na concessão do registro e análise da Pesquisa Clínica, mas também nas avaliações das etapas anteriores de descobrimento e desenvolvimento de medicamentos.

### **3-3- Estudos Não Clínicos de Segurança**

Os estudos não clínicos são essenciais para dar embasamento à administração de novos medicamentos em seres humanos. Esses estudos fornecem informações sobre a farmacodinâmica, farmacocinética e a toxicologia de fármacos em desenvolvimento. Informações de segurança e eficácia obtidas nessa fase são fundamentais para estimar uma dose inicial a ser administrada em humanos e identificar parâmetros que devam ser monitorados para identificar prováveis efeitos adversos (DORATO & BUCKLEY, 1998). Dessa forma, não é difícil constatar que um grande número de entidades químicas candidatas a fármacos não chegam a ser testadas em humanos devido a riscos inaceitáveis detectados em estudos não clínicos.

Os estudos não clínicos de segurança normalmente recomendados para o registro de medicamentos, incluem: estudos de toxicidade de dose única (Toxicidade Aguda), toxicidade

de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e farmacocinética/toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME) (ICH, 2000a).

Os objetivos desses estudos são: caracterizar efeitos tóxicos em órgãos alvos, identificar a relação dose-dependência e o potencial de reversibilidade dos efeitos tóxicos. (ICH, 2000a)

Para que os estudos de segurança em animais possam trazer informações mais consistentes é importante que os mesmos sejam realizados em modelos adequados. Para a escolha dos modelos deve-se ter conhecimento prévio das similaridades e diferenças entre o perfil farmacocinético no animal e no homem. Em geral, os estudos de segurança são realizados em duas espécies diferentes, uma não roedora e outra roedora, visando uma melhor base para extrapolação de dados de toxicidade para humanos. Contudo, Newell, *et al*, (2004) relatam que não é necessária, rotineiramente, a utilização de espécies não roedoras para identificar a segurança em casos de novos agentes antineoplásicos. Segundo os autores, em muitos casos, a avaliação da toxicidade em ratos pode ser suficiente. Exceção nesse sentido é o caso de antifolatos. Outros pesquisadores consideram que para anticorpos monoclonais (que são uma nova classe de antineoplásicos) primatas não humanos (como macaco *Cynomolgus*) seriam o modelo de escolha para estudos toxicológicos e toxicocinéticos (WEINBERG, *et al*, 2005).

Outros fatores que devem ser considerados na escolha do modelo animal são: a facilidade da reprodução ou aquisição da espécie, o tempo de crescimento/desenvolvimento e a facilidade de manuseio em condições experimentais. Baseado nesses fatores tem sido comum a utilização de ratos e cães em investigações de segurança (WHO, 2004).

Para garantir a qualidade na condução desses estudos, é importante que eles sejam realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratório. Há guias específicos sobre esse tema, oriundos de agências reguladoras (como FDA) e outras instituições (como WHO). Para tanto, além de outros cuidados citados nas BPL, os animais selecionados devem ser saudáveis, de preferência livres de patógenos (SPF – *Specific Pathogen Free*), de origem conhecida, possuir peso e idade adequados, não sofrerem estresse, estarem convenientemente aclimatizados no ambiente experimental antes da realização do estudo (WHO, 2004).

A seguir serão apresentados os estudos não clínicos de segurança exigidos, de um modo geral, e mais especificamente para o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos.



### **3-4- Estudos de Toxicidade de Dose Única (Aguda)**

Os estudos de toxicidade aguda podem fornecer informações preliminares sobre órgãos alvos de toxicidade e são úteis também para definir as doses a serem utilizadas nos estudos subsequentes de toxicidade de doses repetidas. Esses estudos também fornecem dados e informações sobre possíveis efeitos esperados em casos de dose excessiva (DORATO & BUCKLEY, 1998).

Segundo o guia *Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals* (FDA, 1996), os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por um fármaco quando uma única dose ou mais de uma dose são administradas durante um período não superior a 24 horas.

Esses estudos, segundo a FDA, devem ser conduzidos pelo menos em duas vias de administração, sendo uma a via preconizada para o uso em humanos e a outra uma que garanta pleno acesso à circulação sistêmica (via endovenosa, se possível). No caso da via preconizada para o uso em humanos ser a via endovenosa, somente o estudo por essa via se faz necessário.

A FDA também recomenda que os animais utilizados sejam observados por 14 dias após a administração da droga. Mortes, alterações clínicas, latência, duração e reversibilidade de sinais e sintomas de toxicidade devem ser registrados. Todos os animais encontrados mortos, ou sacrificados por estarem moribundos ou ao final do período de observação (14 dias) devem ser necropsiados com exame macroscópico das vísceras.

A ICH não tem guia específico para estudos de toxicidade aguda, mas informa que um acordo estabelece que a determinação clássica da DL50<sup>7</sup> deve ser evitada (1º CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE HARMONIZAÇÃO, *apud* ICH, [199-]). Para DePass, (1989), a DL50 determinada com grande precisão estatística possui limitações inerentes aos dados de seus valores e requer a utilização de um grande número de animais. Este método pode ser perfeitamente substituído por outros que fornecem estimativas aproximadas de dose letal utilizando um número mais reduzido de animais. Essas podem ser algumas razões que levaram a ICH a adotar esse tipo de posicionamento em relação à DL50.

O guia M3 *Non Clinical Safety Studies for the conduct of human clinical Trials for Pharmaceuticals* (ICH, 2000a), também recomenda que devam ser utilizadas duas espécies de mamíferos para a avaliação da Toxicidade Aguda e que as doses administradas aos animais devam ser escalonadas.

---

<sup>7</sup> DL50 – Dose Letal Mediana: Dose que mata aproximadamente 50% dos animais tratados (BERKOWITZ & KATZUNG, 2004).

Segundo Gad (2006), a dose máxima administrada não deve ser superior a 2g/kg de peso corporal (do animal). Para DePass, (1989), se não há mortalidade ou sinais clínicos indicativos de toxicidade na dose experimental limite, o estudo pode ser finalizado e a substância pode ser classificada como de baixa toxicidade aguda. Caso haja uma mortalidade parcial (< 100%) e/ou sejam observados sinais clínicos, deve-se reduzir a dose por um fator de dois até encontrar a dose não letal e o NOEL<sup>8</sup>. Caso ocorra 100% de mortes com a dose testada, deve-se reduzir a dose por fator de dez.

A EMEA possui um guia específico para estudos não clínicos de medicamentos antineoplásicos, “*Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products*” (EMEA, 1998). Conforme as orientações desse guia, a partir dos estudos de toxicidade aguda deve ser estabelecido a MTD<sup>9</sup>. A determinação da MTD deve ser feita com a utilização do menor número possível de animais. O período pós-tratamento de observação da sobrevivência de animais deve ser de no mínimo 14 dias. Além disso, esses estudos devem ser realizados anteriormente à Fase I, ou a primeira administração do fármaco a seres humanos. Outro aspecto importante destacado no guia é que em casos, em que os roedores não são bons modelos para avaliar a toxicidade humana (como por exemplo, para os antifolatos ou agentes sobre investigação que contenham um novo mecanismo de ação), a MTD deve ser estabelecida em espécies não roedoras.

Também foi obtido no sítio da EMEA o guia *Note for Guidance on single dose toxicity* (EMEA, 1987) em que é relatado que os estudos de toxicidade de dose única devem ser realizados em duas espécies de mamíferos. O guia está em acordo com o documento da FDA, quando recomenda que o estudo deve ser conduzido por duas vias de administração (inclusive a preconizada para uso em humanos) e que os animais devem ser avaliados por 14 dias após o tratamento.

No seu *Handbook* (WHO, 2004), a WHO esclarece que estudos de toxicidade de dose única devem dar informações sobre possíveis níveis de dose para a primeira administração em humanos e indicações sobre possíveis efeitos da superdosagem (acidental ou intencional). Para a WHO, estudos de dose única devem ser realizados em duas espécies roedoras, por duas vias sendo uma a preconizada para administração em humanos e a outra que assegure máxima exposição (intravenosa).

---

<sup>8</sup> NOEL: No Observed Effect Level - Nível de Efeito Não Observável seria segundo Berkowitz & Katzung (2004), a máxima dose em que o efeito não pode ser observado.

<sup>9</sup> MTD: Maximally Tolerated Dose - Máxima Dose Tolerada - Máxima dose compatível com a sobrevivência. (EMEA, 1998)

O NCI também possui guias específicos para a condução de estudos toxicológicos em medicamentos antineoplásicos. Os guias são apresentados por espécie animal a ser utilizada. Estes guias contêm orientações referentes às condições da espécie a ser utilizada (peso, tamanho, dieta, quarentena, etc), ao desenho experimental a ser seguido e aos tipos de avaliações a serem realizadas. Para estudos de toxicidade aguda, há guias para a utilização de ratos, camundongos e cachorros. Nesses guias, há orientação para que os experimentos sejam conduzidos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório da FDA.

Para a utilização de camundongos há o guia *“Single Dose Toxicity of in Mice”* (NCI, 2003g). Conforme o guia, o peso do camundongo deve ser de aproximadamente 18 a 24 gramas para machos e 17 a 23 gramas para as fêmeas e a idade de 6 a 8 semanas. A alimentação (água e comida) deve ser livre de contaminantes para que não haja interferência no resultado do estudo. O animal deve permanecer em quarentena por no mínimo sete dias antes de ser tratado com o medicamento. Para o experimento são necessários oitenta camundongos de cada sexo (20/sexo x dose de grupo) para três grupos de dose e um grupo controle. Em todos os grupos devem ser avaliados os sinais clínicos, o peso corporal, a patologia clínica (hematologia, química clínica) e todos os animais devem ser necropsiados.

No caso de ratos, o *“Single Dose Toxicity of in Rats”* (NCI, 2003h), recomenda que sejam utilizados ratos de aproximadamente 150 a 200 gramas no caso de machos e 125 a 175 gramas no caso de fêmeas. Os ratos devem ter aproximadamente 8 a 12 semanas de idade. As questões relativas à quarentena e dieta devem ser as mesmas relatadas para os camundongos. Para a realização do estudo devem ser utilizados quarenta ratos de cada sexo (10 /sexo x dose de grupo) para três grupos de dose e um grupo controle. Em todos os grupos devem ser avaliados os sinais clínicos, o peso corporal, a patologia clínica (hematologia, química clínica) e todos os animais devem ser necropsiados.

O *“Single Dose Toxicity of in Beagle Dogs”*, orienta que sejam utilizados cachorros de aproximadamente 8 a 12 meses de idade e de aproximadamente 7 a 14 quilos. A alimentação e a água utilizadas devem ser livres de contaminantes. Os cães devem permanecer em quarentena por no mínimo 14 dias. Os cães selecionados para o estudo devem ter boas condições físicas. Para o experimento devem ser utilizados dois cães de cada sexo para dois grupos de dose e um grupo controle. Devem ser avaliados os sinais clínicos, o peso corporal, dados oftalmológicos, patologia clínica (hematologia, química clínica, determinação do nível da droga no plasma). Deve ser feita necropsia e patologia microscópica.

Em relação às regulações de abrangência nacional, à exceção da RDC 219/04 (BRASIL, 2004a), todas dão informações sobre a realização de estudos de toxicidade de dose

única. As regulações do CNS 01/88 (BRASIL, 1988) e 251/97 (BRASIL, 1997) e a resolução de Boas Práticas Clínicas do Grupo Mercado Comum - Resolução N° 129/96 (MERCOSUL, 1996) estabelecem que devem ser utilizadas três espécies (um mamífero não roedor) para a realização desses estudos e duas vias de administração (a via proposta para uso em humanos e a que assegure plena absorção do fármaco). Já a RE 90/04 (BRASIL, 2004b) considera apenas uma espécie de mamífero e apenas uma via de administração (a via proposta para uso em humanos). Ainda, a Resolução RE 90/04 propõem a estimativa de DL50 (Anexo 7-2).

A OECD possui guias que descrevem como devem ser realizados os Testes de Toxicidade Aguda. O OECD Test Guideline 401 foi elaborado para determinar a DL50, tendo consequentemente a morte de animais como desfecho<sup>10</sup>. Devido ao severo sofrimento e o número considerável de animais utilizados nos testes de DL50, esse guia foi abolido e três novos guias alternativos foram propostos durante a década de 90 (OECD Test Guideline 420, 423 e 425) (TEST GUIDELINE 401, *apud* OECD, s.d.).

O OECD Test Guideline 420 descreve o Procedimento de Dose Fixa (FDP) que envolve a identificação do nível de dose que causa evidência de toxicidade não letal (sinais claros de toxicidade) em vez do nível de dose que causa letalidade. Níveis de dose de 5, 50, 500 e 2000 mg/Kg são geralmente escolhidos para identificar a dose que produz evidente toxicidade para a maioria das substâncias. Esse teste utiliza um número muito menor de animais do que a determinação da DL50 e causa bem menos sofrimento já que o desfecho não é a morte. (Test Guideline 420, 2000 *apud* WHITEHEAD & STALLARD, 2004)

O OECD Test Guideline 423 (Acute Toxic Class – ATC) recomenda o uso de três animais de um sexo por passo. Três pré-identificações de doses padrões são possíveis. Depois, três animais do sexo oposto são então tratados com o nível de dose final utilizada para o primeiro sexo. Esse teste também utiliza um número bem menor de animais do que a determinação da DL50. (TEST GUIDELINE 423, *apud* WHITEHEAD & STALLARD, 2004).

O OECD Test Guideline 425 (*Up-and-Down Method* - UDP) recomenda uma dose individual para animais de um único sexo, geralmente fêmeas, em um intervalo de 24 horas sendo a dose inicial “a melhor estimativa da DL50”. Quando não há informações sobre a substância a ser testada, para o bem estar animal, é utilizada uma dose padrão de 200 a 500

---

<sup>10</sup> Para Oliveira, et al (2006), desfecho seria desenlaces ocorridos nos ensaios. Os dados obtidos com os desfechos respondem às perguntas dos estudos.

mg/Kg de peso corpóreo. Caso haja morte (ou estado moribundo) a dose é diminuída, caso os animais sobrevivam, há aumento de dose. Esse teste, apesar de ter como desfecho a mortalidade, acarreta um número bem menor de mortes do que a DL50 (geralmente não mais que 3 mortes). (TEST GUIDELINE 425, apud OECD, s. d.).

Baseado nos guias, artigos e livros de toxicologia consultados, foi proposto o que deve ser essencial para a condução de estudos de toxicidade de dose única no Brasil.

### **3-5- Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas**

Os estudos de toxicidade de dose repetida têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância após a administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, patologia, histopatologia, além da determinação do NOEL. Estes estudos podem ter durações menores – *Short-term* - (por exemplo, 14 e 28 dias) ou envolver um período mais extenso de administração da droga – *Long-term* - (por exemplo, 90 dias, 180 dias). (BARLOW, et al., 2002; WHO, 2004)

Normalmente são realizados em ratos e cães (às vezes em primata) devido ao extenso conhecimento da fisiologia e patologia dessas espécies, custo e disponibilidade em número de animais saudáveis. Em relação à via de administração, deve sempre ser empregada a via preconizada para uso humano, mas se a absorção por essa via em animais for limitada em relação ao homem, pode ser necessária a administração parenteral. Geralmente três doses são empregadas para demonstrar a relação entre efeitos/doses e para determinar o NOEL (DAYAN, s. d.).

Segundo o guia da ICH, *Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing) – S4* (ICH, 1998), a EMEA e o Japão entendem que seis meses de duração para estudos de toxicidade de doses repetidas são suficientes para a descoberta de potenciais efeitos adversos, mas para a FDA, seis meses não são suficientes. Apesar disso, há um consenso internacional de que estudos em roedores de seis meses e estudos em não roedores de nove meses são suficientes na maioria dos casos.

O guia M3 (ICH, 2000a) tem orientações a respeito da duração dos estudos de toxicidade de doses repetidas submetidos para dar suporte à realização de estudos clínicos. Pôde-se perceber que não foi possível uma perfeita harmonização entre os países integrantes da ICH a respeito do assunto. Há, portanto, orientações diferentes para os países membros em alguns casos. Conforme o guia, os estudos devem ser realizados em duas espécies de mamíferos, sendo uma das espécies, não roedor. Para dar suporte às Fase 1 e 2 de Pesquisa

Clínica, a realização de estudos de toxicidade de doses repetidas de duração mínima de duas a quatro semanas são suficientes para estudos de até duas semanas de duração em seres humanos. A Europa e Estados Unidos consideram que duas semanas sejam a duração mínima necessária, mas, para o Japão, caso sejam realizados estudos de duas semanas em roedores, deverão ser realizados estudos de quatro semanas em não roedores. Os estudos de toxicidade de um, três e seis meses dão suporte a estudos clínicos (Fase 1 e 2) de um, três e seis meses, respectivamente. Para a realização de estudos clínicos das fases supracitadas, com duração superior a seis meses, são necessários estudos de seis meses em roedores e nove meses em não roedores. No caso de estudos clínicos Fase 3, para Estados Unidos e Japão, as recomendações para a duração dos estudos de toxicidade de doses repetidas são as mesmas citadas para as Fases 1 e 2. Para a Europa, estudos de toxicidade de um mês, realizados em duas espécies (uma não roedora), dão suporte a estudos clínicos de até 2 semanas de duração. Estudos de toxicidade de três meses dão suporte a estudos clínicos de até um mês de duração, enquanto estudos de toxicidade de seis meses em roedores e três meses em não roedores dão suporte aos estudos de até três meses de duração em humanos. Para estudos clínicos Fase 3, com duração maior do que três meses, são recomendados estudos de seis meses em roedores e nove meses em não roedores.

Em relação ao guia 407 da OECD – *“Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents”* – pode-se constatar que ele recomenda a utilização de quatro grupos de doses (Controle, Baixa, Média e Alta) e para cada grupo de doses o uso de dez machos e dez fêmeas (apud GAD, 2006). O guia 408 – *“Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents”* trata de estudos de toxicidade subcrônica em roedores para testes de noventa dias. Nesse estudo também são necessários 10 machos e dez fêmeas por dose e 4 grupos de doses (apud GAD, 2006). Para testes de toxicidade subcrônica em não roedores há o guia 409 – *“Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents”* (apud GAD, 2006) que recomenda a utilização de 4 grupos de doses como os outros estudos já descritos, porém com um menor número de animais por dose (4 machos e 4 fêmeas). O guia 452 – *“Chronic Toxicity Studies”* – (apud GAD, 2006) trata dos estudos crônicos em roedores e não roedores. Para roedores recomendam a duração de seis meses e 5 grupos de doses (Controle, Baixa, Média, Alta e Farmacocinética). Para o grupo de avaliação da Farmacocinética em roedores são recomendados 5 machos e 5 fêmeas e para os demais grupos são necessários 20 machos e 20 fêmeas. No caso de não roedores, o guia recomenda a avaliação de nove meses, a utilização de 4 grupos (Controle, Baixa, Média e Alta) sendo que para cada grupo deverá ter 4 machos e 4 fêmeas.

O guia da EMEA, específico para Antineoplásicos (EMEA, 1998), recomenda que os estudos de toxicidade de duas a quatro semanas de duração ou um a dois ciclos sejam realizados em duas espécies roedoras, anteriormente à Fase 1 de Pesquisa Clínica. Para fármacos com novo mecanismo de ação devem ser realizados estudos em roedores e não roedores. No caso desses estudos darem suporte a estudos clínicos (Fase 2 e 3) deve-se utilizar uma espécie roedora e uma não roedora e a duração dos estudos de toxicidade deve ter no mínimo a mesma duração dos estudos clínicos, embora não mais longa que seis meses.

A EMEA possui também o guia “*Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity*” (EMEA, 2000) com recomendações para estudos de toxicidade de doses repetidas. Segundo o guia, devem ser utilizadas duas espécies de mamíferos (um não roedor) e, normalmente, o mesmo número de machos e fêmeas da espécie a ser estudada. A dieta e a água dos animais devem ser de qualidade e composição conhecidas. Em relação à duração dos estudos o guia recomenda que sejam seguidas as recomendações dos guias da ICH. Para a via de administração é orientado que seja utilizada a que se pretende usar em humanos. Devem ser utilizados quatro grupos de doses: Grupo controle, pequena, média e alta dose. A dose pequena deve ser suficiente para produzir um efeito farmacodinâmico, relacionado ao efeito terapêutico desejado ou que resulte em exposição sistêmica comparável à esperada para uso clínico. A dose alta é selecionada para evidenciar a toxicidade órgão-alvo, outra toxicidade não específica ou ser o limite estabelecido para o volume de dose. A dose intermediária *é a média geométrica entre a dose pequena e alta, e*, segundo Gad (2006), deve mostrar o começo dos efeitos tóxicos.

O *Handbook* (WHO, 2004) considera também que os estudos de toxicidade de doses repetidas devem ser realizados em duas espécies de mamíferos (um roedor e um não roedor) com três doses e um grupo controle. Segundo o guia, como campo de observação considera-se: mortalidade e morbidade, mudanças na química clínica, hematologia, urinálise e tamanho dos órgãos. Além disso, devem ser realizadas necropsia e histopatologia.

As regulações de abrangência nacional do CNS 01/88 (BRASIL, 1988) e 251/97 (BRASIL, 1997) divergem das internacionais em relação ao número de espécies a serem utilizadas no estudo. Segundo as nacionais, são necessárias três espécies e de acordo com as internacionais, de maneira geral, são necessárias duas espécies. Além disso, os estudos devem ser realizados por duas vias de administração. A Resolução de Boas Práticas Clínicas do Grupo Mercado Comum - Nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) e a RE 90/04 (BRASIL, 2004a) estão em acordo com a maioria dos guias internacionais que, para os estudos de toxicidade de

doses repetidas recomendam duas espécies, apenas uma via de administração e três níveis de doses a serem utilizados (Anexo 7-2).

O NCI possui guias relativos aos estudos de toxicidade de 14 e 28 dias em ratos e cães: “14 - Day Toxicity Study of in Beagle Dogs” (NCI, 2003b), “14 - Day Toxicity Study of in Rats” (NCI, 2003d), “28 - Day Toxicity Study of in Beagle Dogs” (NCI, 2003c) e “28 - Day Toxicity Study of in Rats” (NCI, 2003e).

Os guias de estudos de toxicidade em ratos, recomendam o uso de animais com peso de 150 a 200 gramas (machos) e 125 gramas a 175 gramas (fêmeas) com aproximadamente 8 a 12 semanas de idade. Deve-se ter cuidado para que água e alimentos administrados aos animais não contenham contaminantes que possam interferir nos resultados. Todos os ratos devem permanecer em quarentena por 7 dias antes das avaliações basais. Para os estudos são necessários quarenta ratos (randomizados) de cada sexo (dez/sexo x grupo de dose) a serem distribuídos em três níveis de doses e um grupo controle. No caso dos estudos de 14 dias, os ratos devem receber o fármaco por 14 dias e, no caso dos estudos de 28 dias, por 28 dias. Nesses estudos devem ser avaliados os seguintes parâmetros:

- Sinais Clínicos: Todos os ratos devem ser observados diariamente até o vigésimo nono dia (para estudos de 14 dias) ou até o quinquagésimo sétimo dia (para estudos de vinte e oito dias) ou com uma maior frequência, caso sinais clínicos justifiquem.

- Peso Corporal: Todos os ratos vivos devem ser pesados individualmente nos dias -5, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26 e anteriormente ao sacrifício dos animais (no caso de estudos de 14 dias) ou nos dias -5, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 36, 43, 50, 57 e anteriormente ao sacrifício (no caso de estudos de 28 dias).

- Patologia Clínica: Hematologia, Química Clínica, Determinação do Nível Plasmático do Fármaco, Necropsia.

Os guias referentes aos estudos de toxicidade com cães Beagle, orientam para a utilização de animais com aproximadamente oito a doze meses de idade e com peso entre 7 e 14 kilos. Deve-se ter cuidado para que água e alimentos administrados aos animais não contenham contaminantes que possam interferir nos resultados. Todos os cães devem permanecer em quarentena por 14 dias antes das avaliações basais. Dois cães de cada sexo devem fazer parte de cada um dos três grupos de dose e do grupo controle. O fármaco deverá ser administrado diariamente por 14 dias ou por 28 dias conforme o estudo a ser realizado. Devem ser avaliados os seguintes parâmetros:

- Sinais Clínicos, peso corporal e oftalmologia. Temperatura corporal e consumo de água e comida também devem ser avaliados nos estudos de 28 dias.



- Patologia Clínica: Hematologia, Química Clínica, Coagulação, Determinação do Nível Plasmático do Fármaco, Necropsia.

Da avaliação dos guias, artigos e livros consultados, ou seja, da revisão realizada, elaborou-se proposta de guia para a condução dos estudos de toxicidade de doses repetidas de medicamentos antineoplásicos no Brasil.

### **3- 6 - Estudos de Toxicidade Reprodutiva**

As conseqüências da exposição humana e animal a agentes teratogênicos dependem da extensão, duração, tempo de exposição e das características do agente. Essas conseqüências podem ser variadas como: problemas relacionados à concepção pela fêmea, aborto, dismorfogênese, nascimento prematuro, baixo peso ao nascimento, mortalidade e morbidade perinatal, disfunção de crescimento e desenvolvimento após o nascimento. Portanto, os estudos não clínicos de toxicidade reprodutiva geram importantes informações sobre o risco da exposição ao medicamento causar danos à reprodução humana (FOLB, s.d.).

A ICH elaborou um guia com orientações específicas para estudos de toxicidade reprodutiva – *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2)* (ICH, 1993). Segundo o Guia, o conjunto de estudos deve incluir a exposição de adultos durante todos os estágios de desenvolvimento, da concepção à maturidade sexual. Para conveniência do estudo esta seqüência integrada de exposição e avaliação pode ser subdividida em:

- Pré-Acasalamento até Concepção (funções reprodutivas de adultos machos e fêmeas, desenvolvimento e maturação de gametas, comportamento de acasalamento, fertilização).
- Concepção até a implantação (funções reprodutivas de adultas fêmeas, desenvolvimento da pré-implantação, implantação).
- Implantação até fechamento do palato duro (funções reprodutivas de adultas fêmeas, desenvolvimento embrionário, organogênese).
- Fechamento do palato duro até o final da gravidez (funções reprodutivas de adultas fêmeas, desenvolvimento fetal e crescimento, desenvolvimento de órgãos e crescimento).
- Nascimento até o fim da lactação (funções reprodutivas de adultas fêmeas, adaptação à vida extra-uterina, desenvolvimento antes do desmame e crescimento).
- Fim da Lactação até Maturidade Sexual (Desenvolvimento pós desmame e crescimento, adaptação à vida independente, início da maturidade sexual).

O guia orienta para que seja utilizada uma espécie de roedor nesses estudos sendo o rato, a mais indicada na maioria dos casos. Nos estudos de embriotoxicidade recomenda-se também o coelho como espécie de mamífero não roedor. As razões para a escolha do coelho são: o extenso conhecimento acumulado sobre a espécie, a disponibilidade e aplicabilidade do animal. Quando o coelho for inadequado, uma outra alternativa de não roedor ou uma segunda espécie de roedor podem ser consideradas dependendo do caso.

Segundo o guia, 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). A duração do tratamento nos estudos de toxicidade de doses repetidas de duas a quatro semanas é semelhante à duração do tratamento nos vários segmentos dos estudos de toxicidade reprodutiva. Tendo determinado a dose alta, as doses pequenas devem ser selecionadas na seqüência descendente e os intervalos entre elas dependem da cinética e de outros aspectos da toxicidade.

Em geral, as vias de administração devem ser similares àquelas preconizadas para uso humano. O ideal é que haja algumas informações sobre a cinética do fármaco antes de iniciar os estudos de toxicidade reprodutiva para a escolha da espécie, do desenho do estudo e da programação de doses.

Esse guia recomenda que um grupo controle seja tratado com o veículo na mesma razão dos grupos testes. Quando o veículo causar efeito ou afetar a ação do fármaco, um segundo grupo controle (não tratado) deve ser estudado.

Para definir a estratégia e desenho mais apropriados para esses estudos, deve-se considerar todos os dados, farmacológicos, cinéticos e toxicológicos disponíveis. Para o guia, a melhor opção é a combinação de estudos com focos em:

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

Para melhor visualização, serão apresentadas em forma de quadro as principais características desses estudos de toxicidade reprodutiva propostas no guia da ICH.

**Quadro 1: Características dos estudos de Toxicidade Reprodutiva**

| Estudos   | Objetivo   | Avaliações  | Animais   | Nº de Animais   | Período de Administração   | Acasalamento                              | Sacrifício Terminal  | Observações  |
|---|--|---|---|---|--|---|--|--|
| Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial | Fêmeas: detectar efeitos no período fértil, implantação e desenvolvimento dos estágios embrionários de pré-implantação. Machos: Poderá detectar os efeitos funcionais (por exemplo, libido, maturação do esperma epididimal) que possam não ser detectados em exames histológicos do órgão reprodutor. | - Maturação de Gametas, Comportamento no acasalamento, Fertilidade, Estágios de Pré-implantação embrionária, Implantação. | - No mínimo, uma espécie, preferencialmente, ratos. | Suficiente para permitir a interpretação significativa de dados | Poderá ser feito com dados de estudos de toxicidade de doses repetidas de no mínimo 1 mês de duração. Contando que efeitos não tenham sido encontrados, um intervalo de tratamento pré-acasalamento de 2 semanas para fêmeas e 4 semanas para machos pode ser usado. O tratamento deve continuar durante toda a fase de acasalamento para os machos e no mínimo até a fase de implantação para a fêmea | 1:1 e devem permitir identificar os pares | Fêmeas: devem ser sacrificadas depois do meio da gravidez<br>Machos: Algum tempo depois do acasalamento, mas é aconselhável a garantia da indução bem sucedida da gravidez | Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, Mudança de peso e tamanho corporal, Consumo de comida, Manchas vaginais, Observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade.<br><br>Final do estudo: Necropsia de todos os adultos, Preservar epidídimo, ovário e útero de todos os animais para possível examinação histológica, Contagem e viabilidade de espermas em epidídimo, Contagem de corpo Lúteo e implantação, vida e morte do feto. |

| Estudos   | Objetivo  | Avaliações  | Animais   | Nº de Animais   | Período de Administração  | Acasalamento | Procedimento Experimental  | Observações   |
|---|---|---|---|---|---|--------------|--|---|
| Desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna | Detectar efeitos adversos nas fêmeas grávidas e lactantes e no desenvolvimento do feto. | Aumento da Toxicidade Relativa para fêmeas não grávidas, mortalidade pré e pós-natal, Crescimento e desenvolvimento alterado, <i>deficits</i> funcionais, incluindo comportamento, maturidade (puberdade) e reprodução. | - No mínimo, uma espécie, preferencialmente, ratos. | Suficiente para permitir a interpretação significativa de dados | Fêmeas devem ser expostas à substância teste da implantação até o final da lactação | -            | Um macho e uma fêmea por ninhada devem ser selecionados para criar na idade adulta e acasalar para avaliação da competência reprodutiva. | <p>Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, Mudança de peso e tamanho corporal, Observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade, Duração da Gravidez, Parto.</p> <p>Final do estudo: Necropsia de todos os adultos, Implantações, Anormalidades, Morte/vida/Peso Corpóreo ao Nascimento, Sobrevivência/ crescimento/Peso Corporal pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, Desenvolvimento Físico, Funções sensoriais e reflexas, Comportamento.</p> |

| Estudos                      | Objetivo  | Avaliações   | Animais  | Nº de Animais   | Período de Administração                       | Acasalamento | Procedimento Experimental  | Observações  |
|------------------------------|---|--|--|---|--|--------------|--|--|
| Desenvolvimento embrio-fetal | Detectar efeitos adversos na fêmea grávida e desenvolvimento do embrião e feto conseqüente da exposição da fêmea da implantação até o fechamento do palato duro | Aumento da Toxicidade Relativa em comparação a fêmeas não grávidas, mortalidade embrio-fetal, Crescimento alterado, Mudanças Estruturais | Usualmente duas espécies, uma roedora (preferencialmente ratos) e uma não roedora (preferencialmente coelhos). | Suficiente para permitir a interpretação significativa de dados | Da implantação até o fechamento do Palato Duro | -            | Fêmeas devem ser sacrificadas e examinadas um dia anterior ao parto. Todos os fetos devem ser examinados quanto a viabilidade e anormalidade | Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, Mudança de peso e tamanho corporal, Consumo de comida, Observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade.<br><br>Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos, Contagem de corpo Lúteo e implantação, Peso Corpóreo individual fetal, Anormalidades fetais, Avaliação grosseira da placenta. |

Fonte: International Conference on Harmonisation – ICH, 1993

O guia M3 (ICH, 2000a) apresenta considerações sobre os estudos de toxicidade reprodutiva que devem ser concluídos anteriormente à inclusão de homens, mulheres sem e com potencial para engravidar e grávidas às fases da Pesquisa Clínica. Segundo o guia, 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 tenha sido realizada nos estudos de toxicidade de doses repetidas. Estudos de fertilidade em machos devem ser concluídos anteriormente a iniciação de Pesquisas Clínicas Fase 3. Mulheres sem potencial para engravidar (pós-menopausa, 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.

No caso da inclusão de mulheres com potencial para engravidar em Pesquisas Clínicas, há considerações distintas entre os países membros da ICH em relação à duração dos estudos de toxicidade reprodutiva. Para o Japão, avaliações de fertilidade e desenvolvimento embrio-fetal devem ser concluídos anteriormente à inclusão de mulheres com potencial para engravidar utilizando métodos anticonceptivos em qualquer fase de Pesquisa Clínica. Na Europa, avaliações de desenvolvimento embrio-fetal devem ser concluídas anteriormente às Pesquisas Clínicas de Fase 1 e estudos de fertilidade em fêmeas devem ser concluídos anteriormente à Fase 3.

Para os Estados Unidos, mulheres com potencial para engravidar podem ser incluídas em Pesquisas Clínicas iniciais sem estudos de toxicidade reprodutiva desde que precauções apropriadas sejam realizadas para minimizar o risco. Essas precauções incluem teste de gravidez, utilização de métodos anticonceptivos de alta eficácia e inclusão somente após período menstrual confirmado. Testes contínuos e monitoramento devem ser suficientes para garantir a conformidade com as medidas para não engravidar durante o período de exposição à droga (que pode exceder o período do estudo). Para a FDA, as avaliações de fertilidade em fêmeas e desenvolvimento embrio-fetal devem ser concluídas antes da Fase 3 de Pesquisa Clínica.

Para as três regiões, todos os estudos de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade devem ser concluídos anteriormente à inclusão de mulheres, com potencial para engravidar que não estejam utilizando métodos anticonceptivos de alta eficácia ou daquelas em que não há certeza se estão ou não grávidas, em qualquer fase de Pesquisa Clínica.

Para a inclusão de mulheres grávidas em Pesquisa Clínica, segundo o guia (ICH, 2000a), é necessário que todos os estudos de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade estejam

concluídos. Geralmente, também são necessários dados de segurança da exposição prévia da droga em humanos.

A FDA possui um *Draft* (um documento apenas para comentários, ou seja, ainda em fase de desenvolvimento) – *Draft Guidance for Reviewers on the Integration of Study Results to Assess Concerns about Human Reproductive and Developmental Toxicities* - (FDA, 2001), que descreve o processo para estimar o aumento dos riscos de desenvolvimento e reprodução como resultado da exposição à droga, quando dados definitivos em humanos são indisponíveis. Esse *Draft* apresenta três fluxogramas para orientar as empresas em como se proceder à medida que alguns tipos de resultados são encontrados nos estudos de toxicidade reprodutiva.

Do sítio oficial da EMEA foi obtido o - *Guideline on Risk Assessment of Medical Products on Human Reproduction and Lactation: From Data to Labeling* (EMEA, 2006a). O guia também recomenda que o rato seja utilizado nos estudos de toxicidade reprodutiva e que o coelho seja a segunda espécie a ser avaliada em estudos de embriotoxicidade. Ainda é considerado que a via de administração seja a mesma da utilização pretendida em humanos. Em relação à avaliação de riscos para lactentes devido à utilização da droga durante a lactação, o documento relata que deverão ser considerados dados não clínicos, farmacocinéticos, e às vezes clínicos. As avaliações não clínicas são compostas de: Transferência para o leite, desenvolvimento de filhotes lactentes, características físicoquímicas e farmacocinéticas da substância, quantidade absorvida estimada e permanência da substância no leite.

O guia específico para Antineoplásicos da EMEA (EMEA, 1998) considera que estudos de toxicidade reprodutiva podem não ser necessários, nos casos nos quais drogas citostáticas/citotóxicas sejam assumidas como causadoras de distúrbios reprodutivos. Contudo, mulheres grávidas podem ser tratadas com esses agentes e, portanto, estudos elucidativos do potencial para toxicidade reprodutiva nessas drogas são estimulados.

No sítio oficial do *Health Canada* (que é o departamento federal que auxilia canadenses a manter e melhorar a saúde), foram encontradas informações a respeito dos guias do OECD: OECD 414 *Teratogenicity*, OECD 415 *One-Generation Reproduction Toxicity Study* e OECD 416 *Two-Generation Reproduction Toxicity Study*.

Segundo o sítio, o guia nº 414 (apud CANADA, [200-]b) trata dos estudos para se avaliar a teratogenicidade (propriedade da substância causar anormalidades estruturais ou funcionais permanentes). A substância teste é administrada diariamente logo depois da implantação e continua a ser administrada até a organogênese. A dose oral de 1000 mg/Kg

mencionada no guia não tem a intenção de servir como dose limite dos testes de toxicidade de desenvolvimento, mas sim, auxiliar na priorização de testes de toxicidade por indicar que, se não são observados efeitos maternos e fetais nessa dosagem, testes de dosagens mais altas devem ser realizados para estabelecer o nível que tais efeitos podem ser produzidos.

Caso dados de estudos realizados com doses mais altas do que o limite sejam disponíveis, os mesmos devem ser avaliados juntamente com outros dados relevantes. Em geral, é considerado que efeitos encontrados somente em doses acima do limite não necessariamente levariam a droga a ser classificada como “tóxica para a reprodução”.

Os Guias nº 415 e 416 da OECD (apud CANADA, [200-]b) são desenhados para fornecer informações gerais a respeito de efeitos da substância testada no desempenho reprodutivo de machos e fêmeas. Estudos realizados de acordo com esses guias podem também fornecer informações preliminares sobre efeitos tóxicos no desenvolvimento, como morbidade neonatal, mortalidade, comportamento e teratogênese. Também são utilizados como guias de estudos subseqüentes.

O NCI não apresenta guias específicos para os estudos de toxicidade reprodutiva.

Segundo consulta realizada nas regulações de abrangência nacional, pôde-se constatar que apenas a resolução de Boas Práticas Clínicas do Grupo Mercado Comum - Resolução Nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) evidencia como esses testes devem ser realizados. Segundo a resolução, estudos de embriotoxicidade (principalmente teratogenicidade) e toxicidade peri e pós-natal deverão ser realizados em pelo menos duas espécies, uma das quais deverá ser não roedora. Deverão empregar-se um mínimo de três níveis de doses, sendo que a maior deverá ser subtóxica. (Anexo 7-2).

Baseado nas consultas realizadas pretende-se extrair o que seria essencial para o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos, referentes aos estudos não clínicos de segurança, especificamente para os de toxicidade reprodutiva.

### **3-7 - Estudos de Genotoxicidade**

Genotoxicidade pode ser definida como a capacidade de um agente danificar o DNA ou alterar a seqüência de DNA de tal maneira que possa causar mutação. Os efeitos mais sérios dessa mutação podem ser neoplasmas (tumor), neoplasmas herdados e defeitos ao nascimento (DORATO & BUCKLEY, 1998). Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar substâncias que induzem danos genéticos de forma direta



ou indireta por vários mecanismos. Esses testes devem possibilitar a identificação do risco com o respectivo dano ao DNA e sua fixação. Fixação do dano ao DNA na forma de mutações genéticas, escala de danos cromossomais, recombinação e mudanças numéricas no cromossomo são geralmente consideradas essenciais para efeitos herdados e o complexo processo de malignidade onde possam ocorrer mudanças genéticas (ICH, 1997a).

O guia S2B – *Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals* – (ICH, 1997a) recomenda uma bateria padrão de testes a ser realizada para a avaliação da genotoxicidade de drogas. Essa bateria de testes é composta pelos seguintes estudos:

- 1- Um teste para mutação genética da bactéria,
- 2- Um teste *in vitro* com avaliação citogenética de dano cromossomal com células mamíferas.
- 3- Um teste *in vivo* para danos cromossomais usando células hematopoiéticas de roedores.

Nesse guia, a própria ICH apresenta situações onde a bateria de testes necessita de alteração. Como exemplo de limitação de testes, o guia cita o caso de drogas que são excessivamente tóxicas para bactérias (por exemplo: alguns antibióticos) e drogas que interferem com o sistema de replicação de células de mamíferos (por exemplo: inibidores da topoisomerase, análogos de nucleosídeos ou inibidores do metabolismo de DNA). Nesses casos, normalmente dois testes *in vitro* de células mamíferas devem ser realizados usando dois diferentes tipos celulares e dois diferentes desfechos (mutação do gene e danos ao cromossomo). Contudo, é ainda importante realizar o teste de mutação reversa da bactéria. No caso de substâncias que apresentam estruturalmente tendência para atividade genotóxica e que a bateria de testes apresentam resultados negativos, podem ser necessários testes adicionais, segundo o guia. A escolha de testes adicionais ou modificações de protocolo depende da natureza química, do conhecimento da reatividade da substância e de dados de metabolismo. Outra limitação da bateria de testes relaciona-se aos testes *in vivo* relativos aos casos em que dados de estudos de toxicocinética e farmacocinética indicam que a substância não é sistemicamente absorvida e, portanto, não são disponíveis nos tecidos alvos do padrão de testes de genotoxicidade. Para essa situação podem-se citar alguns agentes para imagens radiológicas, antiácidos baseados em alumínio e medicamentos de aplicação dermatológica. Nos casos onde a modificação da via de administração não fornece exposição suficiente ao tecido órgão, pode ser apropriada a avaliação apenas *in vitro* de testes de genotoxicidade.

O guia S2A - *Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals* – (ICH, 1995a) apresenta as orientações para a realização dos testes de genotoxicidade. Segundo a ICH, para os testes de mutação genética, com as linhagens de

*Salmonella typhimurium* normalmente citadas em guias (TA1535, TA1537, TA98 e TA100) serão detectadas mudanças dos sítios Guanina-Citosina (G-C). Algumas substâncias mutagênicas também modificam bases de Adenina-Timina (A-T). Por isso, deve-se também incluir linhagens para a detecção de pontos de mutação nos sítios de A-T como *Salmonella typhimurium* TA 102, *Escherichia coli* WP2 ou *Escherichia coli* WP2 pKM101.

O guia relata que testes de aberrações cromossômicas em nucleotídeos de células da medula óssea de roedores podem detectar um amplo espectro de mudanças na integridade cromossomal. A maioria dessas mudanças resulta da quebra de uma ou mais cromátides como evento inicial. A quebra de cromátides ou cromossomas pode resultar em micronúcleos em casos onde um fragmento acêntrico é resultante desse processo. Por isso, testes de aberrações cromossômicas ou de micronúcleos são aceitos para detectar o potencial clastogênico<sup>11</sup> de uma substância. Micronúcleos também podem resultar do atraso de um ou mais cromossomas na anáfase do ciclo celular e dessa forma, também têm o potencial de detectar indutores de aneuploidia<sup>12</sup>.

Numerosos estudos da atividade de substâncias conhecidamente clastogênicas em testes de micronúcleos da medula óssea de camundongos têm demonstrado que em geral os machos são mais sensíveis que as fêmeas para a indução de micronúcleo. Diferenças quantitativas na indução de micronúcleo têm sido identificadas entre os sexos, mas diferenças qualitativas não têm sido descritas. Devem ser utilizados ambos os sexos nos casos onde: diferenças quantitativas existam, haja uma diferença invariável entre os sexos ou haja uma clara diferença de metabólitos entre roedores machos e fêmeas. Tanto ratos quanto camundongos são considerados apropriados para o teste de micronúcleo da medula óssea. Em resumo, apenas a utilização de machos é suficiente para os testes de micronúcleos da medula óssea, a menos que haja diferenças óbvias na toxicidade e metabolismo entre roedores machos e fêmeas.

Segundo Gad (2006), para o teste de micronúcleos em roedores é necessária a utilização de apenas um sexo, se não há discrepância de toxicidade entre os sexos e podem ser utilizados camundongos ou ratos (conforme orientação do guia S2A da ICH), mas acrescenta que deve ser utilizada uma dose máxima de 2 g/Kg, que o estudo deve ser realizado com três níveis de dose e que pode ser realizado em regime de doses agudas ou múltiplas doses.

---

<sup>11</sup> Potencial Clastogênico: Capacidade de uma substância produzir mudanças estruturais no cromossomo (ICH, 1995a).

<sup>12</sup> Aneuploidia: Desvio quantitativo de um número padrão de cromossomas de uma célula ou organismo (ICH, 1995a).

O guia S2A (ICH, 1995a) ainda orienta sobre a avaliação dos resultados. Para o guia, testes *in vivo*, por sua natureza têm a vantagem de fornecer informações sobre a absorção, distribuição e excreção que não são avaliados pelos testes *in vitro*, mas são relevantes para o uso de substâncias em humanos. Além disso, também o metabolismo da substância é mais relevante em testes *in vivo* quando comparados com os sistemas normalmente utilizados para testes *in vitro*. Porém, há um pequeno número de testes *in vivo* validados para a avaliação de genotoxicidade. Caso uma substância tenha sido testada *in vitro* e apresentado resultados negativos, normalmente é suficiente um simples ensaio citogenético *in vivo*.

Para uma substância que induz uma resposta positiva biologicamente relevante em um ou mais testes *in vitro*, pode ser necessária a realização de testes *in vivo* adicionais aos ensaios citogenéticos, usando outros tecidos (que não a medula óssea/sangue periférico). A escolha de testes adicionais deve ser cientificamente justificada.

A ICH ainda possui o guia M3 (ICH, 2000a) que orienta que testes *in vitro* para avaliação de mutações e danos ao cromossomo sejam concluídos anteriormente a primeira exposição da substância a humanos. Ainda, segundo esse guia, a bateria de teste de genotoxicidade recomendada pelo guia S2B, deve ser concluída anteriormente à fase 2 de Pesquisa Clínica.

A WHO em sua publicação - *HANDBOOK – Non Clinical Safety Testing* (WHO, 2004), recomenda a mesma bateria de testes de genotoxicidade da ICH e a verificação dos seus guias específicos para genotoxicidade (S2A e S2B).

Não foi encontrado um guia específico para testes de genotoxicidade no sítio da EMEA. O guia da EMEA para medicamentos antineoplásicos, relata que normalmente não há terapia disponível para pacientes elegíveis para as Fases 1 e 2 no caso específico dessas drogas e que portanto, anteriormente a essas fases da Pesquisa Clínica os testes de genotoxicidade não são necessários. Para a Fase 3 de Pesquisa Clínica, testes de genotoxicidade *in vitro* devem estar concluídos.

Nos sítios da FDA e do NCI também não foram encontrados guias específicos para estudos de genotoxicidade.

No caso das regulações de abrangência nacional, à exceção da RDC 219/04 (BRASIL, 2004a), todas citam os estudos de genotoxicidade. A Resolução do Grupo Mercado Comum – nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) especifica que deverá ocorrer a avaliação *in vivo* e *in vitro* com e sem ativação metabólica. Já RE 90/04 (BRASIL, 2004b) orienta a avaliação *in vivo* do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (Teste de Micronúcleo) e a

Avaliação *in vitro* da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de danos a cromossomas de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo (Anexo 7-2).

Os guias da OECD: Test Guidance 471 - Bacterial Reverse Mutation Test, Test Guidance 473 - *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration, Test Guidance 474 - Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Test Guidance 475 - Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test e Test Guidance 476 - *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test relatam como devem ser conduzidos e operacionalizados os testes de genotoxicidade, (apud FDA, 2006b). Não foram obtidas maiores informações a respeito dos guias da OECD.

A partir dos dados obtidos, serão extraídas as informações consideradas essenciais para a realização dos testes de genotoxicidade para o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos no Brasil.

### **3-8 - Estudos de Tolerância Local**

O princípio dos Estudos de Tolerância Local, segundo Gad (2006), baseia-se no fato de que o ponto de administração de uma substância experimental a mais alta concentração de exposição e, portanto, está sujeito às maiores mudanças físicoquímicas, químicas e farmacológicas.

A ICH não possui um guia específico para Tolerância Local, mas o guia M3 (ICH, 2000a) aborda a necessidade desses estudos para dar subsídios à Pesquisa Clínica. Conforme esse guia, os estudos de Tolerância Local devem ser estudados em animais utilizando vias relevantes para o propósito da administração clínica. A avaliação da tolerância local deve ser realizada anteriormente à exposição da droga a humanos. Ainda, segundo o guia, a avaliação da Tolerância Local pode ser parte de outros estudos de toxicidade.

A EMEA possui um guia específico para Estudos de Tolerância Local - *Note for Guidance on Non Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products* (EMEA, 2001). O guia está em acordo com o M3 da ICH em relação à sua realização ocorrer anteriormente à exposição humana. Conforme citado no guia, os testes de Tolerância Local devem ser realizados nos sítios que entrarão em contato com a droga como resultado do método de administração e também em sítios que poderão entrar em contato acidentalmente ou devido à exposição inevitável ao produto. Os sítios de administração podem ser os mesmos órgãos ou tecidos da intenção do alvo terapêutico (por exemplo: pele para produtos dermatológicos, olhos para produtos oftálmicos) ou pode ser remoto ao alvo terapêutico (por exemplo: *patches* transdermais, medicação intravenosa). O guia da EMEA também está em acordo com o guia

M3 (ICH, 2000a) no sentido de os testes de tolerância local poderem ser parte de outros estudos de toxicidade.

O guia da EMEA descreve pontos a serem considerados nos desenhos dos Estudos de Tolerância Local:

1- Escolha da Espécie: A escolha da espécie dependerá do problema a ser investigado e do modelo de teste considerado apropriado. Normalmente, uma espécie deve ser avaliada para cada tipo de teste.

2- Frequência e Duração da Administração: Deve ser determinada pela condição proposta para administração em uso clínico. Contudo, o período de aplicação não deve exceder quatro semanas. Investigações de tolerância local após administração acidental podem ser realizadas por estudos de dose única.

3- Reversibilidade: Avaliação da Reversibilidade de lesões locais deve ser incluída quando relevante.

4- Preparação a ser testada: Testes de Tolerância Local devem ser conduzidos com a preparação a ser administrada em humanos, usando o veículo e/ou excipientes no grupo controle. Controles Positivos/Substâncias Referentes podem ser incluídas quando necessário.

5- Escolha da Dose: Em geral, a atual concentração da substância ativa a ser utilizada em humanos deverá ser testada. A dose pode ser então ajustada pela variação da frequência de administração.

6- Bem Estar Animal: Em casos de fortes irritações em modelos menos sensíveis, a alteração para modelos mais sensíveis deve ser cuidadosamente considerada. Cuidados também devem ser tomados para minimizar exposições penosas a irritantes devendo-se finalizar o experimento no ponto onde reações adversas severas podem ser observadas e quando da continuação do teste não é esperado o fornecimento de resultados essenciais para avaliação do risco.

7- Via de Administração: Deve ser selecionada de acordo com a via a ser utilizada em humanos. Via de administração diferente em um mesmo animal é permitida desde que os testes não sejam influenciados um pelo outro.

8- Avaliação de Resultados: Avaliações globais de resultados devem incluir uma discussão da adequação do desenho e a significância dos achados para o uso clínico do produto.

Há, nesse guia, procedimentos para vias particulares de administração. São relacionadas as vias comuns (ocular e dermal) e as vias de administração específica (parenteral, vaginal e retal). Serão descritas abaixo as considerações do guia referentes às vias

que, na prática, seriam mais comumente utilizadas por medicamentos antineoplásicos (parenteral) ou que poderiam ser expostas em contato acidental (dérmica).

Em relação aos testes de tolerância dérmica, o guia requer testes de administração única, doses repetidas, uma avaliação do potencial de sensibilidade e, em alguns casos, uma avaliação da fototoxicidade e potencial de fotosensibilização.

Para os testes de tolerância dérmica de dose única, o guia considera que os testes relacionados à corrosão da pele podem ser realizados *in vitro*. Os testes de irritação são geralmente realizados em coelhos, em pele raspada e intacta. Para os testes, veículos controles devem ser incluídos. 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, podem ser necessárias observações acima de oito dias após a administração.

Os testes de tolerância dérmica de doses repetidas, são normalmente conduzidos em coelhos, de pele raspada intacta, se possível por períodos superiores a quatro semanas. Como controle deve-se utilizar apenas o veículo da droga. Outras espécies animais podem ser utilizadas se adequadamente validadas. A pele deverá ser avaliada durante o mesmo período citado para os testes de dose única. Segundo o guia, exames histológicos devem ser considerados caso a caso. Ainda é relatado que considerações devem ser dadas ao tipo e quantidade de alguns produtos de decomposição produzidos. Quando apropriado, esses produtos devem ser caracterizados e avaliados separadamente.

Os testes de tolerância parenteral incluem as vias: intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intratecal, subcutânea e paravenosa. O guia relata que a espécie animal selecionada para o estudo deve ser justificada. As aplicações devem ser de acordo com a via e podem ser:

- Veia disponível da orelha, da cauda ou de membros dianteiros e traseiros,
- Artéria central da orelha do coelho, artérias femorais ou outras artérias disponíveis em outras espécies,
- Músculos Dorsal ou Femoral
- Tecido subcutâneo da parede lateral do tórax
- Tecido paravenoso próximo a uma veia disponível citada acima.

Em relação à frequência das injeções, segundo o guia, deve ser uma única administração. Em alguns casos, administrações repetidas (sete dias) podem ser interessantes. Quando necessário, deve-se comparar com controles (veículo). O volume das injeções e proporção da administração deve ser ajustado de acordo com a espécie animal.

Para única administração, observações repetidas dos animais e dos sítios de injeção devem ser realizados 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. Estudos de reversibilidade e investigações adicionais podem ser requeridos caso a caso.

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.

Segundo o guia, para drogas aplicadas na pele (dérmica, retal ou vaginal), o potencial de sensibilidade deve ser avaliado. Dois sistemas de testes são disponíveis para avaliação do potencial de sensibilidade (ensaio de cobaia e ensaio de linfonodo local). Para o ensaio de cobaia, o documento se refere ao guia da EEC/OECD n° 406.

O ensaio de linfonodo local deve ser conduzido em camundongos fêmeas (de oito a doze semanas de idade) de descendência CBA/Ca ou CBA/J. A substância teste deve ser dissolvida em um solvente apropriado ou veículo. A concentração máxima testada deve ser o mais alto nível obtido evitando a toxicidade sistêmica declarada e irritação local excessiva. Controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada teste. Nódulos de linfonodo devem ser coletados e juntados por animais. O resultado de cada grupo de tratamento é expresso como a média do índice de estimulação (SI). Em adição à avaliação da magnitude do SI, a análise estatística deve ser conduzida incluindo uma avaliação da relação dose-resposta bem como de grupo de doses versus veículo/solvente e grupos controles.

O guia específico para antineoplásicos (EMEA, 1998) relata que drogas antineoplásicas podem ser altamente tóxicas para tecidos que entram em contato com o produto. Também considera que estudos de Tolerância Local devem ser realizados anteriormente à exposição em humanos e que uma avaliação relevante deverá ser feita na via que se pretende administrar a droga em humanos. Para o guia, os testes supracitados podem ser parte de outros estudos de toxicidade (o que está de acordo com a ICH e o guia específico da EMEA). Caso o produto investigacional seja diferente do produto a ser comercializado, testes de tolerância local relevantes devem ser considerados anteriormente à Fase 3 de Pesquisa Clínica.

O *Handbook* (WHO, 2004) faz as mesmas considerações já citadas em outros guias: “Tolerância Local deve ser estudada em animais utilizando vias relevantes para a administração clínica proposta. A avaliação da Tolerância Local deve ser realizada

anteriormente à exposição em humanos. A avaliação de Tolerância Local pode ser parte de outros estudos de toxicidade”.

Não foram encontrados guias sobre Testes de Tolerância Local referentes à FDA e ao NCI.

No caso das regulações de abrangência nacional, podemos observar apenas a citação dos testes de Tolerância Local na Resolução do Grupo Mercado Comum – GMC nº 129/06 (MERCOSUL, 1996) e na RE 90/04 (BRASIL, 2004b), mas, não há descrição de como esses estudos devem ser realizados (Anexo 7-2).

No sítio do Departamento Federal de Saúde do Canadá – *Health Canada* há referências aos guias da OECD 406 e 429. No sítio há o relato que, de acordo com o princípio geral do guia OECD 406 - *Skin Sensitization* (apud CANADA, [200-]a), animais são inicialmente expostos à substância teste por injeção intradérmica e/ou aplicação epidérmica (exposição induzida). Após um período de descanso de 10 a 14 dias (período de indução), durante o qual uma resposta imune pode ser desenvolvida, os animais são expostos às mudanças de doses para determinar se a população teste reage de maneira hipersensível. A extensão e grau da reação na pele pela mudança da exposição na população teste é comparada com a população controle que não recebeu a exposição induzida.

Segundo o sítio, o Ensaio de Linfonodo Local é um método para avaliação do potencial de sensibilidade da pele por substâncias químicas e misturas. A definição de um resultado positivo do teste são três ou maiores aumentos de proliferação de células de nódulos de linfonodos sobre o veículo controle. No passado, resultados positivos do estudo não eram aceitos para sustentar sozinho critérios quando se avaliava uma substância para sensibilização de pele, por exemplo, resultados negativos precisavam ser confirmados por métodos alternativos como OECD 406 "*Skin Sensitization*". O Ensaio de Linfonodo Local tem sido formalmente adotado como o guia teste do OECD nº 429 (apud CANADA, [200-]a).

Baseados na literatura consultada serão extraídos os principais pontos a serem adotados no guia nacional para medicamentos antineoplásicos.

### **3-9 - Estudos de Carcinogenicidade**

O principal objetivo dos testes de carcinogenicidade é identificar substâncias que possam causar um desenvolvimento de câncer em algum sítio 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 (BARLOW; et al., 2002).

A ICH possui três guias específicos para os estudos de carcinogenicidade. O guia S1A – *Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals* – (ICH, 1995b) tem como objetivo definir as condições sobre as quais os estudos de carcinogenicidade devem ser conduzidos, de maneira a evitar a utilização desnecessária de testes em animais e fornecer consistência nas avaliações de regulações mundiais. As considerações fundamentais na avaliação da necessidade de estudos de carcinogenicidade são: a duração máxima do tratamento do paciente e alguma percepção levantada por outras investigações. Outros fatores podem ser também considerados como a população a ser tratada, a avaliação inicial do potencial de carcinogenicidade, a extensão da exposição sistêmica, a (dis) similaridade das substâncias endógenas, o desenho do estudo apropriado, o tempo do cumprimento relativo do estudo para o desenvolvimento clínico.

Em relação à duração e exposição, os estudos de carcinogenicidade devem ser realizados para medicamentos cujo uso clínico esperado se dê de forma contínua por no mínimo seis meses. Certas classes medicamentosas podem não ser usadas continuamente acima de um mínimo de seis meses, mas podem ser propostas para serem utilizadas repetidamente ou intermitentemente no tratamento crônico ou condições recorrentes (por exemplo: medicamentos para rinite alérgica, depressão e ansiedade). Nesses casos os estudos de carcinogenicidade são geralmente também necessários. Para medicamentos administrados de forma infrequente por curta duração de exposição, não são necessários estudos de carcinogenicidade a menos que haja interesse, conforme o guia.

Os estudos de carcinogenicidade podem ser recomendados para algumas drogas se há interesse sobre o seu potencial carcinogênico. Fatores que podem ser considerados incluem: demonstração prévia de potencial carcinogênico na classe do produto que seja considerada relevante para humanos, relação da estrutura-atividade sugerindo risco carcinogênico, evidências de lesões pré-neoplásicas em estudos de doses repetidas, e retenção de compostos ou metabólitos em longo prazo nos tecidos, resultando em reações locais ou outras respostas fisiopatológicas.

O guia ainda descreve que drogas inequivocamente genotóxicas, na ausência de outros dados, são presumidamente espécies trans-carcinogênicas, implicando em perigo para humanos. Tais drogas não necessitam ser sujeitadas a estudos de carcinogenicidade de longo prazo. Contudo, se a intenção é a administração crônica em humanos, os estudos de

toxicidade crônica (acima de um ano) podem ser necessários para detectar efeitos tumorais iniciais.

Quando estudos carcinogênicos são necessários, eles normalmente devem ser finalizados anteriormente à aprovação para comercialização. Contudo, não é necessária a finalização de estudos de carcinogenicidade em roedores antecipadamente à condução de estudos clínicos de larga escala, a menos que haja interesse especial da população estudada.

Para o desenvolvimento de medicamentos para certas doenças sérias, estudos de carcinogenicidade não necessariamente precisam ser realizados anteriormente à aprovação para comercialização, embora devam ser realizados pós-aprovação do medicamento. Isto ocorre, devido à necessidade, de caráter mais urgente, da disponibilidade de medicamentos para doenças que trazem riscos de vida ou debilidades severas, especialmente quando não há terapias alternativas satisfatórias existentes.

Em casos em que a expectativa de vida da população que utilizará o medicamento seja curta (não superior a dois - três anos), estudos de carcinogenicidade de longo prazo podem não ser necessários. Por exemplo, medicamentos antineoplásicos para tratamento de doenças sistêmicas avançadas, geralmente não necessitam de estudos de carcinogenicidade. Em casos em que o agente terapêutico para o câncer é geralmente bem sucedido e a vida é significativamente prolongada, pode ser de interesse a observação de câncer secundário. Quando tais medicamentos são utilizados como terapia adjuvante em pacientes livres de tumor ou como uso prolongado em indicações que não sejam câncer, estudos de carcinogenicidade são geralmente necessários.

Em relação à via de exposição em animais, o guia considera que deva ser realizada na mesma via a ser utilizada clinicamente, quando possível.

O outro guia da ICH – *Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals – S1B* (ICH, 1997b), tem como objetivo uma aproximação da avaliação do potencial carcinogênico dos medicamentos. Segundo esse guia, para a escolha da espécie para estudos de carcinogenicidade de longo prazo deve-se considerar: farmacologia, toxicologia de doses repetidas, metabolismo, toxicocinética e via de administração. Na ausência de evidências claras que favoreçam uma espécie, é recomendado que o rato seja selecionado.

Para o guia podem ser realizados testes adicionais como testes em roedores (*in vivo*) de curto e médio prazo. Para esses testes, deve-se focar na utilização de modelos *in vivo* que forneçam percepções de desfechos carcinogênicos. Esses podem incluir modelos de iniciação-promoção em roedores, ou modelos de carcinogenicidade utilizando transgênicos ou roedores

neonatais. Podem também ser realizados estudos de carcinogenicidade de longo prazo em uma segunda espécie roedora.

Estudos voltados para elucidação de mecanismos são freqüentemente utilizados para a interpretação de tumores encontrados nos estudos de carcinogenicidade e podem fornecer uma perspectiva de sua relevância para a avaliação do risco em humanos. A necessidade do desenho de um estudo investigativo será ditada por propriedades particulares da droga e/ou resultados específicos dos testes de carcinogenicidade. Dose dependência e a relação das condições dos estudos de carcinogenicidade devem ser avaliadas nesses estudos investigacionais. Sugestões incluem:

- Mudanças Celulares: Tecidos relevantes podem ser examinados para mudanças no nível celular usando critérios morfológicos, histoquímicos ou funcionais. Atenções podem ser direcionadas para tais mudanças como a dose-relação para apoptose, proliferação celular, alterações celulares do fígado ou mudanças na comunicação intercelular.

- Avaliações Bioquímicas:

Níveis hormonais no plasma (T3, T4, TSH, Prolactina),

Fatores de Crescimento,

Ligação de Proteínas como  $\alpha_2\mu$ -Globulina,

Atividade enzimática, etc.

Ainda, segundo o guia, evidências de efeitos tumorais da droga em modelos roedores devem ser avaliadas à luz da incidência do tumor e latência, da farmacocinética da droga no modelo roedor quando comparada a humanos e em dados de algum estudo subsidiário ou voltado para elucidação de mecanismos que prestam informações a respeito da relevância dos efeitos observados para humanos.

O resultado dos testes citados acima, deve ser analisado como parte do “peso da evidência” considerando o *status* científico do teste.

O terceiro guia da ICH sobre estudos de carcinogenicidade é denominado *Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals & Limit Dose – SIC(R1)* (ICH, 1994a). Este guia delimita quatro critérios geralmente aceitáveis para seleção de altas doses para estudos carcinogênicos: Máxima Dose Tolerada, Dose-Limite de Efeitos Farmacodinâmicos, Saturação da Absorção e Máxima Dose Disponível. A utilização de outros desfechos farmacodinâmicos, farmacocinéticos ou de toxicidade no desenho do estudo são considerados baseados no racional científico e méritos individuais. Toda informação relevante deve ser considerada para seleção de doses e espécies/descendência para os estudos

carcinogênicos. Estas informações devem incluir conhecimento do uso humano, exposições padrões e metabolismo.

Em relação à seleção de médias e pequenas doses para esses estudos, o guia descreve que essas devem ser consideradas seguindo a integração de dados de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade entre roedores e humanos. A razão para seleção das doses deve ser apresentada. Além disso, são citados seis pontos a serem considerados na seleção das doses: Linearidade da farmacocinética e saturação metabólica, exposição humana e dose terapêutica, resposta farmacodinâmica em roedores, alterações na fisiologia normal de roedores, informações voltadas para elucidação de mecanismos e potencial para efeitos limiares e a imprevisibilidade da progressão da toxicidade observada em estudos de curto prazo.

O guia M3 (ICH, 2000a) relata que não é normalmente necessária a finalização de estudos de carcinogenicidade antecipadamente à condução de estudos clínicos a menos que haja interesse. Ainda ressalta que, para medicamentos para o tratamento de certas doenças sérias, testes de carcinogenicidade, se necessários, podem ser concluídos após a aprovação para comercialização.

A EMEA possui um guia que tem como propósito fornecer não apenas diretrizes para as características práticas da condução de estudos de carcinogenicidade de longo prazo, mas também um desenho estatístico e os princípios da descrição e análise de dados - *Note for Guidance on Carcinogenic Potential* (EMEA, 2002).

Em relação aos animais, o guia remete ao guia da ICH S1B. Além disso, relata que os estudos devem ser iniciados tanto quanto possível após o desmame do animal. Os animais a serem utilizados devem ter boas condições gerais de saúde e isto deve ser mantido durante o estudo. Animais devem ser mantidos sob fatores ambientais padronizados como ciclos de luz e umidade, bem como dieta, hábitos alimentares e ingestão de água que devem ser especificados e documentados.

A droga a ser testada deve ser claramente caracterizada, incluindo seu perfil de impurezas e estabilidade.

Os estudos de carcinogenicidade devem ser conduzidos normalmente em três níveis de doses (o guia remete ao guia S1C da ICH). A prática recomendada é que a condução dos estudos ocorra durante a vida do rato (usualmente 24 meses). Caso outras espécies sejam mais apropriadas, a duração recomendada é de no mínimo 18 meses para camundongos e hamsters.

O guia sugere que tenham no mínimo cinquenta animais por sexo e por grupo de tratamento e grupo controle (dosado com o veículo na mesma via). O número inicial de

animais pode ser extrapolado, se necessário, levando em consideração a expectativa da sobrevivência dos animais. A sobrevivência característica da espécie animal selecionada deve ser considerada quando se determina o tamanho dos grupos. Aproximadamente 25 animais/sexo x grupo são solicitados na programação da necropsia terminal para avaliação histopatológica. Contudo, esse número pode ser diminuído se mais mortes ocorrerem após o estudo, e se a avaliação histopatológica for possível na maioria dos animais que morrem ou são sacrificados moribundos durante o estudo, desde que a incidência do tumor seja avaliada estatisticamente com base na sobrevivência.

Rotineiramente, durante o estudo deve-se monitorar: peso corporal, consumo de alimento, sinais evidentes de toxicidade, massas palpáveis e oftalmoscopia. O propósito primário de estudos de carcinogenicidade é avaliar o potencial tumorogênico da droga. Portanto, estudos devem ser desenhados visando se obter o maior número de informações dos animais utilizados. Quando um efeito específico é esperado com base nas propriedades da substância estudada, grupos adicionais podem auxiliar na monitorização de efeitos toxicológicos e na observação do tempo inicial para o desencadeamento dos mecanismos de indução de tumores. Análises de amostras de sangue de grupos controles devem ser consideradas para avaliar se houve exposição da substância a contaminantes. Estudos voltados para elucidação de mecanismos são importantes para a interpretação de tumores encontrados nos estudos de carcinogenicidade. A necessidade de um estudo investigativo será estabelecida por propriedades particulares da substância e/ou o resultado específico dos testes de carcinogenicidade.

Segundo o guia, como investigações finais devem ser realizadas necropsia e histopatologia. A necropsia completa deve ser feita em todos os animais mortos ou exterminados. Na conclusão do estudo todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e uma necropsia completa deve ser realizada em cada animal. Devem ser examinados histopatologicamente em todos os animais, em todos os grupos os seguintes tecidos (onde aplicável): Glândula Adrenal, Aorta, Medula Óssea, Cérebro inclusive cerebelo, Ceco, Colon, Duodeno, Epidídimo, Esôfago, Globo Ocular com Nervo Óptico, Vesícula Biliar, Coração, Íleo, Jejunio, Rim, Laringe, Fígado, Pulmão, Nódulos Linfáticos, Glândula Mamária (somente em fêmeas), Cavidade Nasal com Nasofaringe e Seio Paranasal, Esôfago, Ovário, Pâncreas, Glândula Paratireóide, Nervo Periférico, Pituitária, Glândula do Prepúcio e do Clitóris, Próstata, Reto, Glândula Salivar, Vesícula Seminal, Músculo Esquelético, Pele, Medula Espinhal, Baço, Estômago, Testículo, Timo, Glândula Tireóide, Língua, Traquéia, Bexiga Urinária, Útero, Vagina, Glândula de Zymbal com ouvido externo e massas tumorais.

Conforme apresentado no guia, na análise de dados, os tipos de respostas podem ser dirigidos para: ocorrências de lesões neoplásicas, número de animais com risco examinados, incidência de tumores combinados de origem histogênica comum, incidência de tumores considerados malignos, soma de tumores malignos e benignos no mesmo tecido quando aplicável e período latente para o aparecimento do tumor. A análise de dados deve ser direcionada para: a avaliação da presença de algum efeito da substância estudada, detectada pela comparação entre a resposta dos três grupos de tratamento, separadamente e em conjunto com a resposta do grupo controle; a avaliação se algum efeito é relacionado à dose evidenciado pela tendência da resposta em grupos de pequenas, médias e altas doses.

O guia ainda considera que outros achados nos estudos devem ser discutidos tais como: um aumento na incidência ou redução da latência de tumores malignos, um aumento na incidência de tumores benignos, uma indução local de tumores no sítio da injeção e uma significância biológica de aumento de tumores. As conclusões obtidas devem ser incluídas no relatório do estudo.

O guia específico da EMEA para avaliação pré-clínica de medicamentos antineoplásicos (EMEA, 1998) considera que normalmente não são necessários estudos de carcinogenicidade para esses medicamentos.

Não foram encontrados, nos sítios da FDA e NCI, guias específicos de estudos de carcinogenicidade para medicamentos. A FDA possui um guia específico para avaliação de segurança para ingredientes de alimentos (FDA, 2006a). Nesse guia há uma parte que descreve os estudos de carcinogenicidade em roedores. As considerações do guia (apesar de ser específico para alimentos) estão de acordo com o guia da EMEA. De forma diferente, pôde-se perceber que o guia define de maneira mais explicativa as pequenas e médias doses a serem utilizadas. Para esse guia a alta dose deve ser a Máxima Dose Tolerada, a pequena dose não deve interferir com o crescimento normal, desenvolvimento e duração de vida dos animais testados e não deve produzir nenhum sinal de toxicidade. A dose média deve produzir sinais mínimos de toxicidade. A dose exata selecionada como intermediária pode depender das propriedades farmacocinéticas da substância teste.

O *Handbook* (WHO, 2004) cita que, historicamente, requerimentos de entidades reguladoras, sugerem a condução de estudos de longo prazo em duas espécies roedoras, normalmente ratos e camundongos (ou, em casos especiais, hamsters), com duração de vinte e quatro meses em ratos e no mínimo dezoito meses em camundongos e hamsters. O *Handbook* cita ainda o esquema mais recentemente adotado pelo guia S1B da ICH que já foi anteriormente descrito.

Em relação às regulações de abrangência nacional, podemos observar apenas a citação dos estudos de carcinogenicidade nas regulações do CNS 01/88 (BRASIL, 1998) e 251/97 (BRASIL, 1997), mas nelas, não há descrição de como esses estudos devem ser realizados. A Resolução do Grupo Mercado Comum – GMC nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) cita que o potencial carcinogênico deverá ser demonstrado mediante provas *in vivo* e *in vitro* (Anexo 7-2).

O guia 451 da OECD (apud CANADA, 2005) recomenda que os estudos de carcinogenicidade sejam realizados por 2 anos em ratos e 18 meses em camundongos. Com justificativa científica apropriada, esses estudos podem ser realizados em uma espécie roedora, preferencialmente o rato. Ainda, segundo considerações do guia da OECD, um mínimo de cinquenta ratos e/ou camundongos por dose (incluindo o grupo controle) por sexo é apropriado para os estudos de carcinogenicidade. É recomendado que no mínimo três níveis de doses e um grupo controle sejam utilizados nos estudos. O guia ainda considera que os tecidos seguintes sejam incluídos àqueles normalmente estudados: glândula do prepúcio e do clitóris (somente roedores), glândula lacrimal, laringe, cavidade nasal, nervo óptico, faringe e glândula Zymbal (somente em roedores).

Com a revisão de guias realizada acima, serão extraídos os principais aspectos a serem considerados para a construção do guia nacional, no que tange aos estudos de carcinogenicidade.

### **3- 10- Estudos de interesse para a avaliação da Segurança Farmacológica**

Os estudos de interesse para a avaliação da segurança farmacológica avaliam os efeitos da droga testada em funções vitais como sistemas: cardiovascular, nervoso central, respiratório e renal. Estes estudos, corretamente executados, fornecem informações preciosas que complementam as avaliações toxicológicas tradicionais. Além disso, concedem informações cruciais para a seleção de novas entidades químicas durante o processo de descobrimento inicial, desenho dos estudos toxicológicos e desenho da monitorização de segurança nos ensaios clínicos (DORATO & BUCKLEY, 1998).

O guia da ICH, *Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals – S7A* (ICH, 2000b), tem como objetivo auxiliar na proteção de participantes de Pesquisa Clínica e pacientes que receberão medicamentos comercializados, em relação a potenciais eventos adversos, enquanto previnem a utilização desnecessária de animais e outros recursos.

O guia define os estudos de interesse na segurança farmacológica como aqueles que pesquisam os potenciais efeitos farmacodinâmicos indesejáveis da substância teste nas funções fisiológicas, em relação à exposição da terapêutica alvo.

Os objetivos dos estudos de segurança farmacológica são: identificar propriedades farmacodinâmicas indesejáveis da substância que tenham relevância para a segurança humana, avaliar efeitos adversos farmacodinâmicos e/ou fisiopatológicos da substância observada em estudos toxicológicos e/ou clínicos e investigar os mecanismos de efeitos adversos farmacodinâmicos observados e/ou suspeitos.

Modelos animais, bem como preparações *ex vivo* e *in vitro* podem ser utilizados como sistemas de teste. Sistemas *in vitro* e *ex vivo* podem incluir, mas não limitar: organismos isolados e tecidos, culturas celulares, fragmentos celulares, organelas subcelulares, receptores, canais de íons, transportadores e enzimas. Sistemas *in vitro* podem ser usados em estudos de apoio (por exemplo: para obter um perfil de atividade da substância ou investigar o mecanismo de efeitos observados *in vivo*).

Na condução de estudos *in vivo*, deve-se usar de preferência animais não anestesiados. No caso desses animais, a redução/anulação do desconforto ou dor é uma consideração importante.

O tamanho dos grupos no estudo deve ser suficiente para permitir interpretação científica de dados gerados. Dessa forma, o número de animais ou preparações isoladas deve ser adequado para demonstrar ou desconsiderar um efeito biologicamente significativo da substância teste. Isto deve levar em consideração a proporção do efeito biológico que é do interesse humano. Grupos de controle positivo e negativo devem ser incluídos no desenho experimental. Em sistemas de testes *in vivo* bem característicos, controles positivos podem não ser necessários.

Em relação à via de administração, o guia considera que, quando possível, a via clínica de administração em humanos deve ser testada em animais. Avaliações de efeitos por mais de uma via pode ser necessária se há intenção de utilizar a substância teste, clinicamente, em mais de uma via de administração (por exemplo: parenteral, oral) ou quando são observadas ou antecipadas diferenças qualitativa e quantitativamente significantes na exposição sistêmica ou local.

Os estudos de interesse para avaliação da segurança farmacológica devem ser desenhados para definir a relação dose-resposta e eventos adversos observados. Na ausência de eventos adversos nos parâmetros de segurança farmacológica avaliados no estudo, a alta dose a ser testada deve ser a dose que produza eventos adversos moderados no estudo ou em



outros de via e duração similares. Esses eventos adversos podem incluir efeitos farmacodinâmicos dose-limitante ou outras toxicidades. Na prática, alguns efeitos da linha tóxica (tremores ou fasciculação durante o registro do ECG) podem confundir a interpretação de resultados e podem também limitar o nível de dose.

Os testes *in vitro* devem ser desenhados para estabelecer uma relação entre concentração-efeito. As concentrações utilizadas devem ser selecionadas para aumentar a possibilidade de detecção de um efeito no teste. O limite superior de concentração pode ser influenciado por propriedades físico-químicas da substância teste e outros fatores específicos da análise.

Os estudos de interesse para avaliação da segurança farmacológica, segundo o guia, são geralmente realizados como administração de dose única. 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 de segurança farmacológica, a duração desses estudos deve ser baseada em critérios racionalmente elaborados.

Em relação aos metabólitos, quando esses contribuem com as ações farmacológicas do agente terapêutico, pode ser importante testá-los quanto à segurança farmacológica. No caso de misturas isoméricas, devem ser realizados testes *in vivo* e *in vitro* para os isômeros de forma isolada. E para as formulações finais, quando essas alteram a farmacocinética e/ou farmacodinâmica da substância ativa em relação à formulação previamente testada, devem também ser conduzidos estudos de interesse para a avaliação da segurança farmacológica.

Conforme o guia, há uma bateria de estudos que tem como propósito, a investigação dos efeitos da substância a ser testada nos órgãos vitais. O guia cita que devem ser estudados os sistemas nervoso central, cardiovascular e respiratório.

No caso do sistema nervoso central, deve-se avaliar: atividade motora, mudanças comportamentais, coordenação, respostas reflexas sensoriais/motoras e temperatura corporal. Além de comportamento farmacológico, aprendizagem e memorização, ligação a receptores específicos, neuroquímica, aspectos visuais e auditivos e/ou exames eletrofisiológicos.

Para avaliação do sistema cardiovascular devem ser estimados: pressão sanguínea, frequência cardíaca, eletrocardiograma e também contração ventricular, resistência vascular, efeitos endógenos e/ou exógenos de substâncias na resposta cardíaca. Avaliações *in vivo*, *in vitro* e/ou *ex vivo*, incluem métodos para repolarização e condução de anormalidades.

O sistema respiratório deve ser avaliado com base na frequência respiratória e outras medidas respiratórias (como volume de ar inalado e exalado por respiração e avaliação da

saturação da hemoglobina). Para avaliação do sistema respiratório, observações clínicas não são geralmente adequadas, mas sim a quantificação dos parâmetros supracitados por metodologia adequada. Também devem ser avaliados resistência aérea, pressão pulmonar arterial, gases e pH sanguíneo.

Quando necessário, devem também ser avaliados os sistemas: renal, nervoso autônomo e gastrointestinal. Em alguns casos também podem ser avaliados outras funções como a endócrina e a imune e os músculos esqueléticos.

O guia ressalta que estudos de interesse para avaliação da segurança farmacológica podem não ser necessariamente finalizados anteriormente à aplicação da droga em humanos em casos de agentes citotóxicos a serem administrados em pacientes vítimas de câncer em estágio terminal. Porém, para agentes citotóxicos com novo mecanismo de ação pode ser necessária a condução de estudos de segurança farmacológica anteriormente à administração clínica.

Segundo o guia, esses estudos devem ser conduzidos anteriormente à primeira administração da droga em humanos. Porém, estudos adicionais podem ser realizados durante a Pesquisa Clínica para esclarecer eventos adversos suspeitos ou observados durante os estudos não clínicos ou clínicos.

Para avaliação do sistema cardíaco, a ICH possui um guia específico para a avaliação do prolongamento da repolarização ventricular denominado *The Non Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals – S7B* (ICH, 2005). Segundo o guia, o prolongamento do intervalo QT pode ser congênito ou adquirido (por exemplo, por indução medicamentosa). Quando a repolarização e o intervalo QT<sup>13</sup> são prolongados, ocorre um acréscimo no risco de taquiarritmia, inclusive *torsade de pointes*<sup>14</sup>, principalmente quando associada a outros fatores de risco como hipocalcemia, doença cardíaca de base e bradicardia.

Portanto, o guia tem como objetivos: identificar o potencial da substância a ser testada e seus metabólitos em prolongar a repolarização ventricular e relatar a extensão do prolongamento ventricular nas concentrações da substância teste e seus metabólitos. Os objetivos são obtidos mediante a condução de testes *in vitro* e *in vivo* para investigação de quatro níveis funcionais:

---

<sup>13</sup> Conforme Simar (2001), o intervalo QT seria o tempo que decorre entre o princípio da despolarização (início da onda Q no complexo QRS) e o fim da repolarização dos ventrículos (onda T) no eletrocardiograma.

<sup>14</sup> *Torsade de pointes*: Torsade é definido como taquicardias polimórficas ventriculares em que a morfologia dos complexos de QRS varia de batida a batida. A taxa ventricular pode variar de 150 batidas por minuto (bpm) a 250 bpm (BESSETE & JACOBSON, 2006).

- 1- Correntes iônicas medidas em animais isolados ou miócitos cardíacos humanos, cultura de linhas celulares cardíacas ou sistemas de expressão heteróloga para canais iônicos humanos clonados.
- 2- Parâmetros da ação potencial em preparações cardíacas isoladas ou parâmetros eletrofisiológicos específicos indicativos da duração da ação potencial em animais anestesiados.
- 3- Parâmetros de Eletrocardiograma (ECG) medidos em animais anestesiados ou conscientes.
- 4- Efeitos pró-arrítmicos medidos em preparações isoladas cardíacas ou animais.

O guia propõe para avaliação dessas funções os seguintes testes:

1- Ensaio  $I_{KR}$  *in vitro*: Avaliação da corrente iônica mediante canais de proteínas nativos ou expressos, como aqueles codificados por hERG.

2- Ensaio QT *in vivo*: Medições de índices de repolarização ventricular como Intervalo QT.

3- Classes Químicas/Farmacológicas: Alguns medicamentos são conhecidamente indutores do prolongamento do intervalo QT em humanos (por exemplo: fluoroquinolonas e antipsicóticos). Portanto, esse aspecto deve ser considerado.

Para o guia, avaliação de informações não clínicas e clínicas relevantes podem incluir estudos: farmacodinâmicos, toxicológicos/segurança, farmacocinética, interações medicamentosas, acumulação e distribuição da droga em tecidos, vigilância pós-comercialização.

O guia relata que estudos para avaliar o risco de prolongamento da repolarização ventricular e do intervalo QT devem ser finalizados anteriormente à primeira administração da substância testada em humanos.

Controles positivos devem ser utilizados e incluídos durante todo o estudo no caso de preparações para canais de íons e testes de duração do potencial de ação. No caso de estudos *in vivo* controles positivos devem ser utilizados para validar e definir a sensibilidade do sistema de teste, mas não necessitam ser incluídos em todo o estudo.

Os estudos eletrofisiológicos *in vitro* empregam preparação de células únicas (por exemplo: sistema de expressão heteróloga, cardiomiócitos desagregados) ou de múltiplas células (por exemplo: Fibras de Purkinge, Músculos Papilares, coração intacto). Preparações celulares e de tecidos para ensaios *in vitro*, são obtidos de diferentes espécies animais incluindo: coelho, cobaia, cão, suíno, e, ocasionalmente, humanos. 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.

A concentração das substâncias testes dos estudos *in vitro* deve cobrir e exceder a concentração plasmática terapêutica máxima. Concentrações ascendentes devem ser testadas até que a curva dose-resposta tenha sido caracterizada ou efeitos físico-químicos resultem em concentração limitante. Idealmente, a duração da exposição deve ser suficiente para obter efeitos eletrofisiológicos “*Steady-State*”<sup>15</sup> a menos que haja impedimento da viabilidade da preparação da célula ou tecido.

No caso dos estudos eletrofisiológicos, *in vivo*, modelos animais intactos permitem investigações da repolarização ventricular ou arritmias associadas onde efeitos integrados do complemento completo dos canais iônicos e tipos celulares são estimados. Também, influências do potencial neuronal e hormonal nos efeitos farmacodinâmicos de medicamentos estão presentes nos animais.

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.

Espécies animais utilizadas para estudos eletrofisiológicos, *in vivo* podem ser: cão, macaco, suíno, coelho e 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 não é considerada adequada.

A dose limite a ser administrada em animais pode ser limitada por intolerância relativa à substância teste apresentada pela espécie utilizada, com possíveis reações como tremores, emese ou hiperatividade.

Conforme o guia M3 (ICH, 2000a), os estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica devem ser conduzidos anteriormente à administração da droga em humanos.

Não foi encontrado no sítio da EMEA, guia específico para estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica. O guia da EMEA específico para medicamentos antineoplásicos (EMEA, 1998) considera que para drogas com um novo mecanismo de ação, uma avaliação de dados de segurança farmacológica deva ser realizada anteriormente à administração da droga em humanos.

---

<sup>15</sup> Segundo FREIRES (2004), *Steady-State* seria o “Estado de Equilíbrio” onde a frequência cardíaca estabiliza e não mais varia, exceto se a intensidade do esforço diminuir.

Ao realizar a busca de informações no sítio da FDA, não foi encontrado guia específico sobre estudos de interesse para avaliação da segurança farmacológica.

O *Handbook* (WHO, 2004) também considera que esses estudos avaliam os efeitos das funções vitais (como sistema nervoso central, cardíaco e respiratório) e que estes devem ser realizados anteriormente à administração em humanos (considerações em conformidade com as indicações da ICH).

Também, não foi encontrada em nenhuma das regulações de abrangência nacional, citações ou descrições de parâmetros a serem avaliados nos estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica (Anexo 7-2).

Ao pesquisar os guias do NCI foram encontrados três guias referentes aos testes para avaliação da segurança farmacológica: *Cardiotoxicity Study of in Beagle Dogs* (NCI, 2003a), *Cardiotoxicity Study in Cynomolgus Monkeys* (NCI, 1996a) e *Neurotoxicity Study of in Beagle Dogs* (NCI, 1996b).

O guia relativo aos estudos de cardiotoxicidade em cães beagle (NCI, 2003a) considera que esses estudos devam ser realizados com o auxílio de animais de aproximadamente 8 a 12 meses de idade e 7 a 14 quilos.

Em relação à dieta dos cães, é ressaltado que a presença de contaminantes em água ou comida pode interferir e afetar os resultados do estudo. Além disso, os cães devem permanecer em quarentena por um mínimo de 14 dias anteriormente às avaliações de base.

Para o desenho experimental, segundo o guia, são necessários oito cães (1/sexo x grupo de dose) para três grupos de dose e um grupo de veículo. A via de administração deve ser intravenosa.

Deve ser administrada uma dose única intravenosa no primeiro dia do estudo. Nos cães do grupo controle deverá ser administrado um volume de veículo equivalente ao maior volume administrado nos grupos com base nos cálculos de ml/kg. Os cálculos das doses devem ser baseados no peso corpóreo individual no dia do tratamento.

Deverão ser realizadas avaliações conforme descrito abaixo:

- Sinais Clínicos e Temperatura Corporal, Peso Corporal,
- Patologia Clínica: Hematologia (Contagem de Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito, VCM, HCM, CHCM, Contagem de Plaquetas, Contagem de Reticulócitos, Contagem Total e Diferencial de Leucócitos), Química Clínica (Uréia, AST, ALT, Fosfatase Alcalina, GGT, Glicose, LDH, Creatinina, Creatino-Quinase, Proteína Total, Bilirrubina Direta e Indireta, Albumina, Globulina, Sódio, Potássio, Cloreto, Cálcio, Fosfato e Troponina).

- Avaliação Hemodinâmica: Animais devem ser monitorados no mínimo noventa e seis horas anteriormente à aplicação da dose até o oitavo dia do estudo. Devem ser realizadas avaliações individuais da pressão sanguínea e frequência cardíaca.

- Necropsia: No caso de cães que morreram durante a realização do estudo, deve-se realizar necropsia completa.

O guia para cardiotoxicidade em macacos *cynomolgus* (NCI, 1996a) considera que devam ser utilizados macacos adultos jovens (com maturidade sexual) com peso corpóreo de aproximadamente 2,0 a 4,0 kg.

No caso da dieta, contaminantes não devem estar presentes na alimentação ou água para que não haja interferência nos resultados do estudo.

Os macacos a serem utilizados no estudo devem passar por um período mínimo de quarentena de 38 dias antes de se iniciar o estudo.

Para o desenho experimental devem ser utilizados dois macacos (um macho e uma fêmea) e a substância a ser testada deve ser administrada via intravenosa no primeiro dia do estudo.

Em conformidade com as avaliações citadas no guia de cardiotoxicidade para cães, devem-se também fazer avaliações de: sinais clínicos, peso corporal, consumo de alimento, patologia clínica, avaliação hemodinâmica e necropsia (macacos que morreram durante o estudo).

Para avaliação de neurotoxicidade em cães beagle (NCI, 1996b), o NCI em seu guia considera que se faz necessária a utilização de cães machos e fêmeas de aproximadamente 8 a 12 meses de idade e de aproximadamente 7 a 14 quilos. A dieta e água devem ser livres de contaminantes para se evitar a interferência nos resultados do estudo. Os cães devem permanecer por no mínimo 14 dias em quarentena anteriormente às avaliações basais.

Para o desenho experimental são necessários seis cães (1/sexo x grupo) que deverão ser randomizados para dois diferentes grupos de dose e um grupo controle (que deverá conter apenas o veículo da formulação). A droga a ser testada deverá ser administrada intravenosa no primeiro dia do experimento.

As avaliações devem ser realizadas conforme os estudos anteriormente citados: Sinais clínicos, temperatura corporal, peso corpóreo, consumo de água e alimento, patologia clínica, necropsia.

Além dessas avaliações, devem ser acrescentadas as seguintes:

- Determinação do nível da droga no plasma,

- Exames clínicos neurológicos e neurofisiológicos: Em cada cão deverão ser realizados exames clínicos neurológicos e neurofisiológicas nos -3, 7 e 30 dias do experimento. Os parâmetros avaliados nos exames neurológicos clínicos deverão incluir estado mental, modo de andar e postura, reação postural, reflexos espinhais, exames dos nervos cranianos e testes sensoriais. Os parâmetros a serem avaliados nos exames neurofisiológicos são: eletromiograma, estudos de condução dos nervos motores e sensitivos.

No caso da necropsia, o cão mais afetado de cada grupo de tratamento deve ser sacrificado no oitavo dia do experimento. Cães sobreviventes serão sacrificados no trigésimo primeiro dia do experimento. Os cães deverão ser sacrificados com uma overdose intravenosa de barbitúricos seguido de exsanguinação.

O OECD possui um guia denominado *OECD 424 Neurotoxicity Study in Rodents* (OECD, 2004) que, conforme a instituição foi desenvolvido como um regime de doses repetidas, administração oral, e tendo o rato como espécie de escolha. Baseado na expectativa do uso humano pode ser necessária a realização de estudos em outras vias de exposição.

Conforme descrições apresentadas nos guias serão extraídos os aspectos considerados de maior relevância e necessidade para serem incluídos no guia de estudos não clínicos a nível nacional.

### **3-11 Estudos de Toxicocinética**

Toxicocinética é definida como um componente integral na condução de estudos de toxicidade não clínica 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. O foco desses estudos é primariamente a interpretação dos testes de toxicidade e não simplesmente a caracterização dos parâmetros farmacocinéticos básicos da substância a ser testada. (ICH, 1994b).

A ICH, em seu guia *Note for Guidance on Toxicokinetics: The assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies – S3A* (ICH, 1994b) considera como objetivo primário dos estudos de toxicocinética, a descrição da exposição sistêmica obtida em animais e a sua relação com o nível de dose e o tempo.

Como objetivos secundários descritos no guia podemos citar:

- Relato da exposição obtida em estudos de toxicidade para achados toxicológicos e 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.

- Fornecimento de informações que em conjunto com achados toxicológicos contribuam para o desenho de estudos não clínicos de toxicidade subsequentes.

Em relação à quantificação da exposição, o guia sugere que a mesma seja representada por concentração plasmática (soro ou sangue) ou AUC<sup>16</sup> da substância e/ou seus metabólitos. Em algumas circunstâncias, estudos podem ser desenhados para avaliar as concentrações nos tecidos.

O monitoramento toxicocinético e o perfil dos estudos de toxicidade devem estabelecer qual nível de exposição tem sido alcançado durante o curso do estudo e podem também servir para alertar toxicologistas quanto às mudanças não lineares, na relação de doses na exposição, que possam ter ocorrido. Informações toxicocinéticas podem permitir melhores comparações entre espécies em relação às comparações dose única/peso corporal (ou superfície corpórea).

Para o guia, os tempos de coleta de amostra de fluidos corpóreos, devem ser tão freqüentes quanto necessário sem interferir com a condução normal do estudo ou causar *stress* fisiológico desnecessário aos animais. Em cada estudo, o número de vezes da realização da coleta de amostras deve ser justificado baseado na adequada exposição estimada. A justificativa deve ser baseada nos dados cinéticos obtidos em estudos de toxicidade iniciais, pilotos ou de níveis de doses obtidos, estudos distintos de mesmo modelo animal, ou em outros modelos onde seja possível a extrapolação.

Para os estudos de toxicocinética deve ser utilizada uma série de doses, baixa, média e alta. No caso da dose baixa, deve-se preferencialmente estabelecer um nível de dose sem efeito tóxico. Para níveis intermediários, a dose deve representar um múltiplo apropriado (ou fração) da exposição de menor (ou maior) dose conforme os objetivos dos estudos de toxicidade. As altas doses são normalmente determinadas por considerações toxicológicas. Contudo, as exposições obtidas nos níveis de doses devem ser avaliadas.

Segundo o guia, exposições sistêmicas devem ser estimadas em número de animais e grupos de doses apropriados para fornecer a base da avaliação de risco da droga a ser testada. Estudos toxicocinéticos podem ser realizados também em todos ou em uma proporção representativa de animais utilizados no estudo principal ou em grupos satélites<sup>17</sup> especiais. Normalmente, amostras para a geração de dados de toxicocinética podem ser coletadas de

---

<sup>16</sup> AUC: Área sob a curva tempo X concentração de zero até o tempo T. (ICH, 1994b).

<sup>17</sup> Para a ICH (1994b), Grupos Satélites se referem a grupos de animais incluídos no desenho e na condução de estudos de toxicidade tratados e mantidos sob condições idênticas àquelas dos animais do estudo principal, mas utilizados, a princípio, para estudos de toxicocinética.



estudos principais, nos quais animais maiores são envolvidos, mas grupos satélites podem ser necessários para espécies menores (roedores).

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 principal é normalmente estimada a exposição em animais de ambos os sexos, a menos que haja alguma justificativa para não se fazer dessa maneira.

Para análise toxicocinética devem-se considerar alguns fatores que ocorrem, algumas vezes, de forma diferente entre as espécies e podem, dessa maneira, interferir na avaliação dos resultados como: ligação às proteínas, propriedades receptoras e perfil metabólico. Além disso, pode-se perceber que baixa concentração plasmática relativa, altos níveis da substância administrada e/ou metabólito podem ocorrer em órgãos ou tecidos específicos.

Em relação à via de administração da substância, devem-se considerar as propriedades farmacocinéticas da droga administrada pela via que se pretende utilizar em humanos.

Segundo o guia, pode haver a necessidade da determinação de metabólitos em circunstâncias nas quais medidas de concentrações dessas substâncias no plasma ou outros fluidos corporais são especialmente relevantes na toxicocinética. Isto pode ocorrer quando:

- o composto administrado é uma pró-droga e o metabólito originado é reconhecido como a entidade ativa primária.
- o composto metabolizado resulta em um ou mais metabólitos toxicologicamente e farmacologicamente ativos que podem acarretar em uma contribuição significativa na resposta de tecidos e órgãos.
- o composto administrado é extensamente metabolizado e as concentrações no plasma ou tecidos do metabólito principal são consideradas como o meio prático de se estimar a exposição do composto em estudos de toxicidade.

O guia ainda descreve as considerações dos estudos toxicocinéticos a serem aplicadas nos diversos estudos toxicológicos já apresentados.

#### Estudos de Toxicidade de Dose Única:

Esses estudos são frequentemente realizados em fases iniciais do desenvolvimento de drogas antes de métodos bioanalíticos terem sido desenvolvidos e, portanto, o monitoramento toxicocinético nesses estudos normalmente não é possível.

Estudos toxicocinéticos adicionais 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 assessorar na seleção apropriada dos níveis de doses a serem utilizados em estudos posteriores.

#### Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas

Para esses estudos, o regime de tratamento e as espécies a serem utilizadas devem ser selecionados considerando os princípios da farmacocinética e da farmacodinâmica. A Toxicocinética deve ser incorporada apropriadamente no desenho desses estudos. Ela pode consistir no perfil de exposição ou monitoramento dos níveis de doses apropriados no período de tratamento do primeiro estudo de doses repetidas. O procedimento a ser adotado para estudos posteriores irá depender do resultado do primeiro estudo e de alguma mudança no regime de tratamento proposto. O monitoramento ou perfil poderá ser estendido, reduzido ou modificado para determinados compostos onde problemas surjam na interpretação dos estudos de toxicidade iniciais.

#### Estudos de Genotoxicidade:

Conforme descrito no guia, para resultados negativos de estudos de genotoxicidade *in vivo*, pode ser apropriado demonstrar a exposição sistêmica na espécie utilizada ou a caracterização da exposição em tecido indicado.

#### Estudos de Carcinogenicidade:

O monitoramento apropriado ou perfil desses estudos deve ser responsável por gerar dados toxicocinéticos que podem assessorar nos desenhos de estudos principais. Os dados toxicocinéticos podem auxiliar na seleção de níveis de dose em casos onde a exposição clínica do evento apresenta uma cinética não linear que pode dificultar a interpretação do estudo.

Para o guia, a princípio, o desenho do estudo ideal deveria assegurar que níveis de doses em estudos de carcinogenicidade gerassem uma escala de valores de exposição sistêmica que excedesse a exposição máxima terapêutica em humanos. Contudo, é reconhecida que a seleção ideal de níveis de dose pode ser afetada por problemas espécie-

específicos inevitáveis. Dessa forma, a necessidade de se estimar a exposição sistêmica para compostos e seus metabólitos ocorre para que achados de estudos possam ser considerados na perspectiva da comparação da exposição entre o modelo animal e o humano.

Para os testes principais, o regime de tratamento e espécie a ser selecionada devem, tanto quanto possível, serem determinados considerando as informações farmacocinéticas e toxicocinéticas disponíveis.

#### Estudos de Toxicidade Reprodutiva:

O guia relata que 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. Nesta etapa, a informação não necessita ser sofisticada ou derivada de fêmeas grávidas ou lactantes. Informações futuras sobre a farmacocinética em fêmeas grávidas ou lactantes podem ser necessárias dependendo do resultado obtido em estudos iniciais.

A limitação da exposição em testes de toxicidade reprodutiva é normalmente dirigida pela toxicidade materna. Então, enquanto o monitoramento toxicocinético em estudos de toxicidade reprodutiva pode ser valioso, especialmente no caso de substâncias com baixa toxicidade, em outras situações tais dados podem não ser necessários. Quando a exposição sistêmica adequada é questionada devido à ausência de resposta farmacológica ou efeitos tóxicos, princípios toxicocinéticos devem ser aplicados de forma proveitosa para determinar a exposição obtida em diferentes estágios do processo reprodutivo. Um grupo satélite de fêmeas pode ser utilizado para coletar dados de toxicocinética.

No caso de estudos de fertilidade, devem ser adotados os princípios gerais referentes aos estudos de toxicidade de doses repetidas. A necessidade da monitoração desses estudos dependerá do regime de dose utilizado e da informação disponível de estudos anteriores na espécie selecionada.

Para estudos com fêmeas grávidas e lactantes, o regime de tratamento durante a exposição deve ser selecionado com base em achados toxicológicos e princípios farmacocinéticos e toxicocinéticos.

Deve-se considerar o fato da possibilidade de que a cinética poderá diferir entre fêmeas grávidas e não grávidas.

As avaliações toxicocinéticas podem envolver exposições de embriões, fetos ou recém-nascidos com dias especificados. 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 secreção no leite.

Também deve-se considerar interpretações de testes de toxicidade reprodutiva em espécies nas quais a transferência placentária da substância não pôde ser demonstrada.

A ICH possui um segundo guia sobre os estudos de toxicocinética denominado *Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies – S3B* (ICH, 1994c) onde é relatado que os estudos de distribuição nos tecidos, da droga a ser testada, são essenciais para fornecer informações da distribuição e acumulação da substância e seus metabólitos, especialmente em relação aos potenciais sítios de ação. Esta informação pode ser proveitosa para assessorar os desenhos de estudos toxicológicos e farmacológicos e auxiliar na interpretação dos resultados desses experimentos.

Segundo o guia, estudos de distribuição da droga nos tecidos de doses repetidas não devem ser solicitados para todas as substâncias testadas e devem somente ser conduzidos quando dados apropriados não podem ser obtidos de outras fontes. Esses estudos podem ser apropriados em determinadas circunstâncias como: quando a droga testada apresenta uma aparente meia-vida<sup>18</sup> considerável, eliminação incompleta ou toxicidade imprevista em órgãos. O desenho e tempo dos estudos de distribuição de doses repetidas devem ser determinados caso a caso.

O guia M3 (ICH, 2000a) considera que dados toxicocinéticos de exposição em animais devem ser avaliados anteriormente à exposição da droga testada a humanos. Informações posteriores sobre o ADME em animais devem estar disponíveis para que se possam comparar as vias metabólicas em humanos e animais. Informações apropriadas devem normalmente estar disponíveis no tempo em que a Fase I da Pesquisa Clínica tiver sido completada.

A EMEA possui um guia denominado – *Pharmacokinetics and metabolic studies in the safety evaluation of new medicinal products in animals* (EMEA, 1994). Esse guia considera que esses estudos são importantes para assegurar o nível da substância/ metabólitos e da sua cinética nos fluidos e órgãos corporais. Além disso, a partir deles se obtêm informações da relação do órgão alvo de toxicidade e as concentrações da substância, avalia-se a possibilidade da indução enzimática e acúmulo da substância no caso de administrações

---

<sup>18</sup> Segundo Berkowitz & Katzung (2004), Meia-vida seria o tempo necessário para a alteração da quantidade da droga no corpo para a metade durante a eliminação (ou durante uma infusão constante).

repetidas, e possibilita a escolha de espécies animais mais similares para serem comparadas ao homem.

Segundo o guia, a escolha da espécie utilizada deve ser justificada e a via a ser utilizada no estudo, quando possível, deve ser a mesma que se pretende administrar a droga em humanos.

O guia específico para medicamentos antineoplásicos (EMEA, 1998), considera que a avaliação de parâmetros cinéticos limitados, por exemplo, níveis de pico plasmático, AUC, e informações sobre a MTD em animais utilizados para estudos pré-clínicos, podem facilitar a definição de doses a serem administradas durante a Fase 1 da Pesquisa Clínica. Informações futuras de ADME em animais devem normalmente estar disponíveis anteriormente às Fases 2 e 3 de Pesquisa Clínica.

Não foram encontrados no sítio da FDA, guias específicos sobre os estudos de toxicocinética.

O *Handbook* (WHO, 2004) descreve exatamente o texto do guia M3 da ICH em relação aos estudos de toxicocinética concordando, dessa forma, com as considerações da instituição de harmonização.

No caso das regulações de abrangência nacional, há apenas a citação desses estudos na Resolução N° 1 do CNS (BRASIL, 1988) e uma descrição concisa do que deve ser realizado na Resolução do Grupo Mercado Comum – GMC n° 129/96 (MERCOSUL, 1996). Pela resolução do Mercosul deverão ser realizados os seguintes estudos para a avaliação da Farmacocinética: farmacocinética de dose única, farmacocinética pós-administração repetida, distribuição em animais gestantes e não gestantes, biotransformação, excreção e interações farmacocinéticas (Anexo 7-2).

No caso dos guias da OECD, foi constatada no sítio oficial da instituição a existência de um guia sobre estudos de Toxicocinética – OECD 417 – *Toxicokinetics* (OECD, 2006). Porém, não se obteve informações sobre esse guia de fontes secundárias.

O NCI possui um guia denominado *Pharmacokinetics and Dose Range-Finding Study of in Beagle Dogs* (NCI, 2003f) que tem como objetivo determinar a cinética da eliminação plasmática e toxicidade relativa em cães com dose única intravenosa da droga a ser testada.

Segundo o guia devem ser utilizados cães machos e fêmeas de aproximadamente 8 a 12 meses de idade e 7 a 14 kilos. A água e comida, a serem fornecidas aos animais, devem ser livres de contaminantes que possam interferir ou afetar os resultados do estudo. Os cães devem permanecer em quarentena por no mínimo 14 dias anteriores às avaliações basais.

Baseado na revisão de dados realizada, foram propostas considerações para a condução de estudos de toxicocinética.

**4- RESULTADO**

**GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE  
SEGURANÇA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE  
MEDICAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS**

## **INTRODUÇÃO:**

O presente Guia é uma orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos. 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.

A sua elaboração foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMEA), e de instituições de interesse na área (ICH, OECD, NCI, WHO), visando uma maior harmonização com as regulações internacionais. 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 droga 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 droga poderão ser necessários conforme o caso.

O guia é específico para medicamentos antineoplásicos, portanto, as considerações apresentadas a seguir, não necessariamente se aplicam aos estudos não clínicos de segurança referentes a drogas pertencentes a outras classes terapêuticas.

Medicamentos antineoplásicos são entendidos nesse documento como substâncias utilizadas no tratamento de pacientes acometidos por neoplasias, tendo como objetivos essenciais a produção de efeitos benéficos na história natural da doença ou a influência favorável na qualidade de vida dos pacientes.

Os estudos propostos devem ser conduzidos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e os animais a serem utilizados deverão ser saudáveis, de preferência 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.

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 medicamentos antineoplásicos 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 a serem desenvolvidas com esses fármacos.



### **ESTUDOS DE TOXICIDADE DE DOSE ÚNICA (AGUDA)**

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma droga quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas (FDA, 1996).

Estes estudos devem ser realizados anteriormente à Fase I da Pesquisa Clínica.

Para a boa condução do estudo, as seguintes orientações devem ser consideradas:

- Realizados em uma espécie roedora (rato), exceto para casos onde essas espécies não apresentem boa correlação com a toxicidade humana (como por exemplo, para os antifolatos) ou agentes sob investigação que contenham um novo mecanismo de ação, quando também deverão ser utilizadas em espécies não roedoras.
- Utilização de duas vias de administração (a preconizada para humanos e a endovenosa).
- Dosagem Máxima a ser administrada: 2 g/kg por peso corporal.
- Período de observação dos animais: 14 dias após a administração da droga.
- Parâmetros a serem avaliados: mortalidade, sinais clínicos, peso corporal, patologia clínica (hematologia, química clínica), latência, duração e reversibilidade de toxicidade e necropsia.
- Não é exigida a determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) por método que implique em grande precisão estatística. Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais.

### **ESTUDOS DE TOXICIDADE DE DOSES REPETIDAS**

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 nas funções fisiológicas, hematológicas, química clínica, patologia, histopatologia, além de informações sobre a indicação do Nível de Efeito Não Observável (NOEL) (WHO, 2004).

Os dados de segurança obtidos nesses estudos dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica.

Considerações para os estudos de toxicidade de doses repetidas:

- Via de administração: deverá ser utilizada a via em que a droga será administrada, mas se a absorção em animais for limitada em relação ao homem, também a via parenteral.
- Espécies a serem utilizadas: uma roedora (rato) e uma não roedora (geralmente cães).
- Dosagens (Mínimo): Três grupos de doses (Baixa, Média e Alta) e um grupo controle.
- Duração Mínima dos estudos de Toxicidade de Doses Repetidas: Vide quadro abaixo.

| Duração da Pesquisa Clínica | Duração Mínima dos Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas |              |
|-----------------------------|---|--------------|
|                             | Roedores  | Não Roedores |
| Dose Única                  | 2 Semanas   | 2 Semanas    |
| Até 2 Semanas               | 2 Semanas   | 2 Semanas    |
| Até 1 mês                   | 1 Mês   | 1 Mês        |
| Até 3 meses                 | 3 Meses   | 3 Meses      |
| Até 6 meses                 | 6 Meses   | 6 Meses      |
| Acima de 6 meses            | 6 Meses   | 9 Meses      |

- Parâmetros a serem avaliados:

- Roedores: Mortalidade, Sinais Clínicos, Peso Corporal, Hematologia, Química Clínica, Determinação do Nível Plasmático da Droga, Necropsia.
- Não Roedores: Mortalidade, Sinais Clínicos, Peso Corporal, Oftalmologia.

Temperatura corporal, Consumo de Água e Comida, Hematologia, Química Clínica, Coagulação, Determinação do Nível Plasmático da Droga, Necropsia.

### **ESTUDOS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA:**

O objetivo dos estudos de toxicidade reprodutiva é revelar algum efeito de uma ou mais substâncias ativas na reprodução de mamíferos. Por este propósito investigações e interpretações dos resultados devem ser relacionados com outros dados farmacológicos e toxicológicos disponíveis, para determinar onde riscos potenciais para a reprodução humana são maiores, menores ou iguais àqueles relativos a outras manifestações toxicológicas (ICH, 1993).

A informação sobre os efeitos tóxicos do medicamento na reprodução é essencial para garantir a exposição segura de humanos às drogas. Para medicamentos antineoplásicos, excepcionalmente, poderá ser avaliada pela Anvisa a dispensa da apresentação desses testes, em casos onde o benefício da disponibilidade do medicamento ao paciente supere o risco de sua exposição e quando é devidamente informado aos usuários o seu potencial efeito tóxico sobre a reprodução. Contudo, é estimulada a realização desses estudos para um melhor conhecimento sobre a toxicidade da droga.

Os estudos de toxicidade reprodutiva devem ter como foco principal o conhecimento de efeitos da droga na fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial, no desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna e no desenvolvimento embrio-fetal.

Considerações para os estudos de toxicidade reprodutiva:

- Espécies a serem estudadas:

- Estudos de fertilidade/desenvolvimento embrionário inicial e desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna: No mínimo uma espécie roedora (rato).

- Estudos de desenvolvimento embrio-fetal: No mínimo em duas espécies, uma roedora (rato) e uma não roedora (coelho).

- Vias de administração: Similares àquelas preconizadas para uso humano.

- Parâmetros a serem avaliados:

Estudos de fertilidade/desenvolvimento embrionário inicial:

Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, mudança de peso e tamanho corporal, consumo de comida, manchas vaginais, observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade.

Ao Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos, implantações, anormalidades, Morte/vida/peso corpóreo ao nascimento, sobrevivência/ crescimento/peso corporal pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, desenvolvimento físico, funções sensoriais e reflexas, comportamento.

Estudos de desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna:

Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, mudança de peso e tamanho corporal, observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade, duração da gravidez, parto.

Ao Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos, implantações, anormalidades, Morte/vida/peso corpóreo ao nascimento, sobrevivência/ crescimento/peso corporal pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, desenvolvimento físico, funções sensoriais e reflexas, comportamento.

Estudos de desenvolvimento embrio-fetal:

Durante o estudo: sinais clínicos e mortalidade, mudança de peso e tamanho corporal, consumo de comida, observações que possam contribuir com outros estudos de toxicidade. Ao Final do Estudo: Necropsia de todos os adultos, contagem de corpo Lúteo e implantação, peso corpóreo individual fetal, anormalidades fetais, avaliação grosseira da placenta.

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

Considerações sobre os estudos de toxicidade reprodutiva que devem ser concluídos anteriormente à inclusão de homens, mulheres sem e com potencial para engravidar às fases da 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 (pós-menopausa, 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 anticonceptivos: avaliações de fertilidade e desenvolvimento embrio-fetal devem ser concluídos anteriormente à inclusão dessas mulheres nas fases de Pesquisa Clínica.

Mulheres com potencial para engravidar que não estejam utilizando métodos anticonceptivos de alta eficácia ou aquelas em que não há certeza se estão ou não grávidas: todos os estudos de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade devem ser concluídos anteriormente à inclusão dessas mulheres nas fases de Pesquisa Clínica.

**ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE:**

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar substâncias que induzem danos genéticos de forma direta ou indireta por vários mecanismos. Esses testes devem possibilitar a identificação do risco com o respectivo dano ao DNA e sua fixação (ICH, 1997).

Para a avaliação da genotoxicidade de substâncias é recomendada uma bateria de testes que inclua os seguintes estudos:

- 1- Um teste para mutação genética da bactéria,
- 2- Um teste *in vitro* com avaliação citogenética de dano cromossomal com células de mamíferos.
- 3- Um teste *in vivo* para danos cromossomais usando células hematopoiéticas de roedores.

Para o teste de mutação genética 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 ou *Escherichia coli* WP2 pKM101.

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 discrepância de toxicidade entre os sexos, três níveis de doses e dose máxima de 2 g/Kg.

Os testes de aberrações cromossômicas em nucleotídeos de células da medula óssea de roedores podem detectar um amplo espectro de mudanças na integridade cromossomal.

No caso específico de medicamentos antineoplásicos, quando pacientes elegíveis para as Fases 1 e 2 não possuem terapia alternativa disponível, após avaliação do caso pela Anvisa, os testes de genotoxicidade poderão ainda não estar finalizados. Essas situações excepcionais poderão ocorrer quando o benefício do tratamento for superior ao risco de ainda não se ter informações suficientes sobre a genotoxicidade. Para a Fase 3 de Pesquisa Clínica, testes de genotoxicidade *in vitro* deverão estar concluídos.

No caso de tratamentos disponíveis, anteriormente à exposição de pacientes à droga, os testes *in vitro* para avaliação de mutações e danos ao cromossomo deverão estar concluídos. Para a inclusão de pacientes em fase 2 de Pesquisa Clínica, a bateria de teste de genotoxicidade deverá estar concluída.

#### **ESTUDOS DE TOLERÂNCIA LOCAL:**

Os testes de Tolerância Local devem ser realizados nos sítios que entrarão em contato com a droga como resultado do método de administração e também em sítios que poderão entrar em contato acidentalmente ou devido à exposição inevitável ao produto (EMEA, 2001).

A avaliação da Tolerância Local deve ser realizada anteriormente às fases de Pesquisa Clínica e poderão ser parte de outros estudos de toxicidade.

Serão realizadas abaixo considerações referentes às vias que, na prática, seriam mais comumente utilizadas por medicamentos antineoplásicos ou que poderiam ser expostas em contato acidental.

##### Via dérmica:

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 acima de 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:

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

Via Parenteral:

- A espécie animal selecionada para o estudo deve ser justificada.
- Frequência de administração: Única. Em alguns casos, administrações repetidas (sete dias) podem ser interessantes.
- 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.

### **ESTUDOS DE CARCINOGENICIDADE:**

O principal objetivo dos testes de carcinogenicidade é identificar substâncias que possam desenvolver câncer em algum sítio 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 (BARLOW; et al., 2002).

No caso de medicamentos antineoplásicos, os estudos de carcinogenicidade de longo prazo, podem, excepcionalmente, não ser solicitados pela Anvisa quando a expectativa de vida da população que utilizará a substância for curta (não superior a dois – três anos), desde que a população exposta à droga seja devidamente informada sobre os riscos da substância e sobre o andamento dos estudos de segurança. Em casos onde o agente terapêutico para o câncer é bem sucedido e a vida é significativamente prolongada, ou onde o mesmo será utilizado como terapia adjuvante em pacientes livres de tumor, estudos de carcinogenicidade são normalmente necessários.

Para os estudos de carcinogenicidade devem ser considerados os seguintes aspectos:

- Especificamente para medicamentos antineoplásicos, estudos de carcinogenicidade não necessariamente precisam ser finalizados anteriormente à aprovação para comercialização.
- A via a ser administrada a droga em animais deverá ser a mesma utilizada clinicamente em humanos.
- Para a escolha da espécie deve-se considerar: farmacologia, toxicologia de doses repetidas, metabolismo, toxicocinética e via de administração. Na ausência de evidências claras que favoreçam uma espécie, recomenda-se o rato como uma das espécies a ser selecionada.
- Conduzidos em duas espécies roedoras, normalmente ratos e camundongos (ou, em casos especiais, hamsters),
- Duração de estudos de carcinogenicidade de longo prazo: 24 meses em ratos e, no mínimo, 18 meses em camundongos e hamsters.
- Quantitativo de animais: Mínimo 50/sexo x grupo de tratamento e grupo controle.

- Devem ser conduzidos no mínimo em três doses além do grupo controle: Dose Pequena, Média, Alta.

Dose Alta: Máxima Dose Tolerada, Dose-Limite de Efeitos Farmacodinâmicos, Saturação da Absorção ou Máxima Dose Disponível.

Dose Média: Deve produzir sinais mínimos de toxicidade. Pode depender das propriedades farmacocinéticas da substância teste.

Dose Pequena: Não deve interferir com o crescimento normal, desenvolvimento e duração de vida dos animais testados e não deve produzir nenhum sinal de toxicidade.

- Durante o estudo deve-se monitorar: peso corporal, consumo de alimento, sinais evidentes de toxicidade, massas palpáveis e oftalmoscopia.

- Como investigações finais devem ser realizadas: necropsopia e histopatologia.

- Devem ser examinados histopatologicamente em todos os animais, em todos os grupos os seguintes tecidos (quando aplicável): Glândula Adrenal, Aorta, Medula Óssea, Cérebro inclusive cerebelo, Ceco, Colon, Duodeno, Epidídimo, Esôfago, Globo Ocular com Nervo Óptico, Vesícula Biliar, Coração, Íleo, Jejuno, Rim, Laringe, Fígado, Pulmão, Nódulos Linfáticos, Glândula Mamária (somente em fêmeas), Cavidade Nasal com Nasofaringe e Seio Paranasal, Esôfago, Ovário, Pâncreas, Glândula Paratireóide, Nervo Periférico, Pituitária, Glândula do Prepúcio e do Clitóris, Próstata, Reto, Glândula Salivar, Vesícula Seminal, Músculo Esquelético, Pele, Medula Espinhal, Baço, Estômago, Testículo, Timo, Glândula Tireóide, Língua, Traquéia, Bexiga Urinária, Útero, Vagina, Glândula de Zymbal com ouvido externo e massas tumorais.

- Achados a serem considerados nos estudos de carcinogenicidade: ocorrências de lesões neoplásicas, número de animais com risco examinados, incidência de tumores combinados de origem histogênica comum, incidência de tumores considerados malignos, soma de tumores malignos e benignos no mesmo tecido, quando aplicável, período latente para o aparecimento do tumor, aumento na incidência ou redução da latência de tumores malignos, aumento na incidência de tumores benignos, indução local de tumores no sítio da injeção e significância biológica de aumento de tumores.

### **ESTUDOS DE INTERESSE PARA A AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA FARMACOLÓGICA:**

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, em relação à exposição da terapêutica alvo. (ICH, 2000)

A partir desses estudos são avaliadas funções vitais desenvolvidas pelos sistemas: nervoso central, cardíaco e respiratório. Quando necessário, deve-se também avaliar o sistema renal, nervoso autônomo, gastrointestinal e ainda função endócrina, imune e os músculos esqueléticos.

Em casos de fármacos a serem administradas em pacientes vítimas de câncer em estágio terminal onde o benefício se sobressaia ao risco induzido pela droga, 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.

### Características dos estudos:

Via de Administração: A mesma via a ser administrada em humanos, quando possível.

Administração: São geralmente realizados como administração de dose única. Quando efeitos farmacodinâmicos ocorrem somente depois de certo período de tratamento, quando resultam de estudos não clínicos de doses-repetidas ou quando resultados da utilização em humanos levam ao aumento de interesse sobre os efeitos sobre a segurança farmacológica, a duração deve ser baseada em critérios racionalmente elaborados.

Metabólitos: quando contribuem com as ações farmacológicas do agente terapêutico, pode ser importante testá-los quanto à segurança farmacológica.

### Estudos para avaliar a toxicidade da droga no Sistema Nervoso Central:

Para estudos de neurotoxicidade em cães, são necessários seis cães (1/sexo x grupo) que deverão ser randomizados para dois diferentes grupos de dose e um grupo controle (veículo da formulação).

Deverão ser avaliados parâmetros gerais: Sinais clínicos, temperatura corporal, peso corpóreo, consumo de água e alimento, patologia clínica, necropsia.

Além disso, também deverão ser realizadas avaliações neurológicas e neurofisiológicas como:

- Neurológicas: Estado mental, modo de andar e postura, reação postural, reflexos espinhais, exames do nervo craniano e testes sensoriais.
- Neurofisiológicas: Eletromiograma, estudos de condução dos nervos motores e sensores.

### Estudos para avaliar a toxicidade da droga no Sistema Respiratório:

O sistema respiratório deve ser avaliado com base na frequência respiratória e outras medidas respiratórias (como volume de ar inalado e exalado por respiração e avaliação da saturação da hemoglobina). Para avaliação do sistema respiratório, observações clínicas não são geralmente adequadas, mas sim a quantificação dos parâmetros supracitados por metodologia adequada. Também devem ser avaliados resistência aérea, pressão pulmonar arterial, gases e pH sanguíneo.

### Estudos para avaliar a toxicidade da droga no Sistema Cardíaco:

Para avaliação do sistema cardiovascular devem ser estimadas: pressão sanguínea, frequência cardíaca, eletrocardiograma e também contração ventricular, resistência vascular, efeitos endógenos e/ou exógenos de substâncias na resposta cardíaca. Avaliações *in vivo*, *in vitro* e/ou *ex vivo*, incluem métodos para repolarização e condução de anormalidades.

Para avaliação do prolongamento da repolarização ventricular pode-se utilizar o ensaio IKR *in vitro* e o ensaio QT *in vivo*.

Os estudos eletrofisiológicos *in vitro* empregam preparação de células únicas (por exemplo: sistema de expressão heteróloga, cardiomiócitos desagregados) ou de múltiplas células (por exemplo: Fibras de Purkinge, músculos papilares, coração intacto). Preparações celulares e de tecidos para ensaios *in vitro*, são obtidos de diferentes espécies animais incluindo: coelho, cobaia, cão, suíno, e ocasionalmente humanos. 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.

Espécies animais utilizadas para estudos eletrofisiológicos, *in vivo*, podem ser: cão,

macaco, 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*. 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.

Para estudos de cardiotoxicidade em cães beagle, são necessários oito cães (um/sexo/grupo de dose) para três grupos de dose e um grupo controle (veículo da formulação). Para estudo de cardiotoxicidade em macacos *cynomolgus* devem ser utilizados dois macacos (um macho e uma fêmea). A substância a ser testada (em ambos os casos) deve ser administrada (na via em que se pretende utilizar em humanos) no primeiro dia do estudo.

Deverão ser realizadas avaliações conforme descrito abaixo:

- Sinais Clínicos e Temperatura Corporal, Peso Corporal,
- Patologia Clínica:
- Avaliação Hemodinâmica: Animais devem ser monitorados no mínimo noventa e seis horas anteriormente a aplicação da dose até o oitavo dia do estudo. Devem ser realizadas avaliações individuais da pressão sanguínea e frequência cardíaca.
- Necropsia: No caso de cães e macacos que morreram durante a realização do estudo, deve-se realizar necropsia completa.

### **ESTUDOS DE TOXICOCINÉTICA:**

Toxicocinética é definida como um componente integral na condução de estudos de toxicidade não clínica 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 (ICH, 1994).

Para esses estudos, 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).

Para fármacos antineoplásicos, avaliação de parâmetros cinéticos, como por exemplo, níveis de pico plasmático, AUC, e informações sobre a Máxima Dose Tolerada (MTD) em animais utilizados para estudos pré-clínicos, pode facilitar a definição de doses a serem administradas durante a Fase 1 da Pesquisa Clínica. Informações de ADME em animais devem normalmente estar disponíveis anteriormente às Fases 2 e 3 de Pesquisa Clínica

- Os tempos de coleta de amostra de fluidos corpóreos, devem ser tão frequentes quanto necessário, sem interferir com a condução normal do estudo ou causar *stress* fisiológico desnecessário aos animais.

- Em cada estudo, o número de vezes da realização da coleta de amostras deve ser justificado. 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.

- Doses a serem utilizadas:

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.

- Via de Administração: A mesma a ser utilizada na administração em humanos, quando possível.
- 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.
- Para análise toxicocinética devem-se considerar fatores como: ligação às proteínas, propriedades receptoras e perfil metabólico.
- Em alguns casos pode ser necessária a avaliação de metabólitos como, por exemplo:  
Quando a substância é uma pró-droga,  
Quando a metabolização da substância resulta em um ou mais metabólitos toxicologicamente e farmacologicamente ativos,  
Quando a substância é extensamente metabolizada.

Seguem abaixo as considerações dos estudos toxicocinéticos a serem aplicadas nos diversos estudos toxicológicos:

#### Estudos de Toxicidade de Dose Única:

Estudos toxicocinéticos adicionais 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.

#### Estudos de Toxicidade de Doses Repetidas:

Para esses estudos, o regime de tratamento e as espécies a serem utilizadas devem ser selecionados considerando os princípios da farmacocinética e da farmacodinâmica. 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, serem determinados considerando as informações farmacocinéticas e toxicocinéticas disponíveis.

### Estudos de Toxicidade Reprodutiva:

É importante 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 grávidas 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 grávidas e não grávidas.

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.

## **5- CONSIDERAÇÕES**

### **5-1 Considerações para a condução de estudos de toxicidade de dose única (aguda) no Brasil**

Como o propósito do trabalho foi a elaboração de um guia, foi pensado em uma orientação prática e não em um “passo a passo” da realização dos estudos. Portanto, a idéia foi propor o que seria essencial para a condução dos estudos.

Primeiramente é essencial que esses estudos sejam realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratório. Há a necessidade de se ter o cuidado em utilizar animais saudáveis, de origem conhecida, peso e idade adequados. Os estudos deveriam ser realizados anteriormente à administração da droga em seres humanos, ou seja, anteriormente à Fase I da Pesquisa Clínica.

Os estudos de dose única para medicamentos antineoplásicos devem ser realizados em uma espécie roedora e em casos onde essas espécies não apresentem boa correlação com a toxicidade humana (como por exemplo, para os antifolatos) ou agentes sob investigação que contenham um novo mecanismo de ação, os estudos devem ser realizados também em espécies não roedoras, de acordo com a maioria de guias consultados. Essas informações foram discrepantes apenas nas regulações de abrangência nacional.

Em relação à DL50, devido à utilização de um grande número de animais e às limitações de seus valores, a sua determinação não deveria ser exigida, como atualmente é na RE 90/04 (BRASIL, 2004b).

Um período de 14 dias de observação dos animais após a administração da droga foi indicado na maioria dos guias pesquisados e também a realização dos estudos em duas vias (a que se deseja utilizar a droga e a outra a via endovenosa).

Deveriam ser observados durante esses 14 dias, segundo a bibliografia analisada, a mortalidade, os sinais clínicos, peso corporal, patologia clínica (hematologia, química clínica), o tempo de início, duração e reversibilidade de toxicidade e ser realizada uma necropsia.

As considerações apresentadas garantiriam a coleta de dados essenciais de toxicidade aguda para se assegurar um mínimo de segurança à administração da droga em seres humanos.

## **5-2 Considerações para a condução de estudos de toxicidade de doses repetidas no Brasil**

Em relação à quantidade de grupos de estudos a serem analisados pôde-se perceber certa concordância entre a bibliografia analisada – três grupos de dose e um grupo controle para a maioria dos estudos à exceção dos estudos de toxicidade crônica propostos pela OECD para roedores - guia 452 – (apud GAD, 2006) que sugere além desses grupos, um grupo para avaliação farmacocinética.

Um dos pontos mais questionáveis foi a duração dos estudos de toxicidade para que pudessem dar suporte às diferentes fases da Pesquisa Clínica. Considerando a questão risco-benefício que é inerente aos medicamentos antineoplásicos e o fato de esse guia ser a primeira orientação sobre estudos de segurança não clínica, optou-se por considerar as propostas com menores tempos de duração para esses estudos, mas que fossem aceitas pelas principais agências internacionais.

Para as espécies a serem estudadas, também se optou pela concordância da maioria, utilizando-se uma espécie roedora (rato) e uma não roedora (geralmente cães).

Para as questões relativas aos parâmetros a serem avaliados, foram consideradas as orientações dos guias do NCI por serem as bibliografias que apresentaram claramente esses itens.

## **5-3 Considerações para a condução de estudos de toxicidade reprodutiva no Brasil**

O guia específico para o desenvolvimento de antineoplásicos (EMEA, 1998), considera que estudos de toxicidade reprodutiva possam não ser necessários para esses medicamentos desde que os antineoplásicos sejam assumidos como causadores de distúrbio reprodutivos, mas estimula a realização desses estudos para que sejam obtidas informações relevantes sobre essas drogas. Baseando-se na questão risco *versus* benefício dos antineoplásicos, pode-se considerar razoável a argumentação da EMEA constante do Guia, uma vez que a mesma pode não suprimir o acesso da população a medicamentos que talvez possam vir a ser a melhor alternativa disponível para aumentar a sobrevida de pacientes naquele momento, mas também pondera o risco da utilização desses medicamentos, assumindo que tais medicamentos possam ser causadores de toxicidade reprodutiva. Contudo, acredita-se que essa conduta deve ser seguida de uma rigorosa vigilância e monitoramento de pacientes expostos ao fármaco.

Para o Brasil, foi considerado que esses estudos deverão ser apresentados podendo ser dispensados em alguns casos nos quais o benefício da disponibilização da droga ultrapasse o risco causado por ela.

Na bibliografia consultada pôde se perceber que a ênfase deve ser dada aos estudos com efeitos na: fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial, desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna e desenvolvimento embrio-fetal. Houve concordância em que as melhores espécies a serem estudadas são o rato e o coelho (embriotoxicidade).

Os estudos necessários para o suporte a cada fase da Pesquisa Clínica deverão ser apresentados no Guia a ser desenvolvido. Conforme guia M3 (ICH, 2000a) há uma divergência de opiniões sobre os estudos que devem ser realizados anteriormente a cada fase e qual fase seria mais indicada para a inclusão de mulheres. Considerando que ainda não temos mecanismos de acompanhamento de estudo no país (como inspeção) bem estruturados, optou-se por uma posição mais conservadora, como a adotada pelo Japão, onde avaliações de fertilidade e desenvolvimento embrio-fetal devem ser concluídos anteriormente à inclusão de mulheres com potencial para engravidar utilizando métodos anticonceptivos em qualquer fase de Pesquisa Clínica.

Com as informações obtidas na bibliografia consultada pretende-se apresentar no guia, de forma sucinta o que seria essencial para a condução desses estudos.

#### **5-4 Considerações para a condução de estudos de genotoxicidade no Brasil**

Os estudos de genotoxicidade apresentam uma particularidade que é o fato da bateria de testes ser realizada não apenas *in vivo* mas também *in vitro*.

No caso dos testes de genotoxicidade pôde-se perceber que as considerações da ICH tiveram grande destaque até mesmo em outras referências consultadas (que não as da própria Conferência).

O guia da EMEA, específico para medicamentos antineoplásicos (EMEA, 1998), considera a questão “risco-benefício”, quando cita que geralmente não há terapia disponível no caso de pacientes elegíveis para Fase 1 e 2 para Pesquisas Clínicas com essas drogas, e que portanto, os testes de genotoxicidade para essas fases não são necessários. Essa questão deverá ser apresentada de forma bem clara no guia a ser proposto para que de modo algum, pacientes que apresentem alguma terapia alternativa possam ser prejudicados em estudos que não apresentam dados de genotoxicidade da droga. Para que pacientes que apresentam terapia

alternativa sejam elegíveis para o estudos Fase 1 e 2, deverão ser seguidas as determinações estabelecidas pela ICH no guia M3 (ICH, 2000a) para as drogas, de maneira geral.

Na bibliografia consultada não houve discrepâncias de informações. Até as regulações de abrangência nacional, em suas considerações, estavam em acordo com os guias internacionais consultados.

Baseado nas bibliografias e nas considerações específicas aos medicamentos antineoplásicos, foram criadas as orientações do guia.

### **5-5 Considerações para a condução de estudos de Tolerância Local no Brasil**

Na bibliografia consultada não houve grandes discrepâncias de pareceres a respeito dos Testes de Tolerância Local. Pôde-se perceber um reduzido número de guias específicos sobre o assunto - apenas um - *Note for Guidance on Non Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products* - (EMA, 2001) o que pode, de certa forma, ter limitado a análise específica dos métodos.

Os guias foram unânimes nas considerações de que os Testes de Tolerância Local devem ser realizados anteriormente à Pesquisa Clínica e que esses testes poderão fazer parte de outros estudos de toxicidade.

Pretendeu-se no guia proposto, dar ênfase aos testes necessários para as vias que possam ser utilizadas para a administração de medicamentos antineoplásicos ou que possam entrar em contato com a droga acidentalmente.

Baseado nas informações obtidas, considerou-se de forma sucinta no guia elaborado, o que seria essencial para a realização desses estudos no desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos.

### **5-6 Considerações para a condução de estudos de Carcinogenicidade no Brasil**

O primeiro aspecto importante a ser considerado baseia-se na necessidade ou não da realização deste estudo para medicamentos antineoplásicos. Apesar do guia específico para medicamentos antineoplásicos (EMA, 1998) considerar que normalmente não são necessários estudos de carcinogenicidade para esses medicamentos, o guia S1A (ICH, 1995b) parece ter definido de forma mais racional a necessidade ou não desses estudos. Para o guia S1A, os estudos não seriam necessários onde se espera uma baixa sobrevida dos usuários, mas onde possa ocorrer uma melhoria significativa dessa sobrevida ou onde a substância possa ser utilizada como adjuvante para garantir que não haja recidiva em pacientes livres de tumor, os

estudos de carcinogenicidade seriam geralmente necessários. Essa parece ser uma exposição mais plausível para a questão risco-benefício inerente à terapia do câncer, uma vez que, onde o benefício é significativamente maior que o risco, ou seja, baixa sobrevida, em muitos casos sem terapia disponível, o paciente poderia ter acesso a algo que poderia lhe trazer uma melhora. Mas em casos, nos quais já exista uma expectativa de vida e de cura da doença em maior vantagem, os estudos de carcinogenicidade seriam essenciais para que esses pacientes não fossem expostos a riscos mais significativos.

Os guias da ICH, não descreveram, de forma clara, questões operacionais como o quantitativo da espécie, duração dos estudos, espécies a serem utilizadas. Esses aspectos foram mais bem definidos em outros guias como o da EMEA e não foram observadas discrepâncias operacionais significativas nos guias pesquisados.

Foram encontrados guias para resíduos de drogas veterinárias em alimentos (CANADA, 2005) e avaliação de segurança de ingredientes alimentares (FDA, 2006a) que, em relação aos estudos de carcinogenicidade, apresentavam-se em acordo com os guias específicos de medicamentos.

Em relação às regulações nacionais, a Resolução do Grupo Mercado Comum –GMC nº 129/96 (MERCOSUL, 1996) cita que o potencial carcinogênico deverá ser demonstrado mediante provas *in vivo* e *in vitro*. Porém, não foram encontrados nos guias internacionais pesquisados, referências a estudos *in vitro*.

Com as informações obtidas, foram absorvidas as considerações gerais necessárias à condução de estudos de carcinogenicidade no país e elaborada a proposta de guia especificamente para esses testes.

### **5-7 Considerações para a condução de estudos de interesse para a avaliação da Segurança Farmacológica no Brasil**

De maneira geral, nos guias consultados, foi dada ênfase à realização de estudos para se avaliar no mínimo a toxicidade da droga nos sistemas nervoso central, cardíaco e respiratório.

Não foram observadas grandes discrepâncias nos guias, mas sim uma complementação entre os guias da ICH e do NCI. Os guias dessas entidades descreveram como se deve conduzir a realização desses estudos e quais espécies são mais indicadas.

É importante ressaltar que, para todos os guias, esses estudos devem ser realizados anteriormente à administração da droga em humanos. Porém, o guia da ICH (ICH, 2000b)

ressalta que em casos de medicamentos utilizados na terapia de câncer terminais pode ser avaliado o fato de não se ter terminado a realização desses estudos anteriormente à administração em humanos. Esse fato ressalta a avaliação do risco-benefício inerente ao desenvolvimento dessa classe terapêutica tão observada nos diversos guias consultados no decorrer desse trabalho.

Baseado no guias consultados foi desenvolvido o item do guia nacional referente aos estudos de interesse para a avaliação da segurança farmacológica.

### **5-8 Considerações para a condução de estudos de Toxicocinética no Brasil**

Nos guias consultados foi descrita com muita clareza a importância dos estudos de toxicocinética na avaliação da segurança da droga e para a interpretação de dados obtidos nos diversos estudos de toxicologia. Além disso, não foram observadas discrepâncias de informações nos guias analisados.

Foi demonstrada, no guia da ICH (ICH, 1994b), a utilização dos estudos de toxicocinética em cada estudo de toxicidade já estudado. Essas considerações contidas no guia da ICH farão parte do guia proposto, uma vez que acredita-se que essas avaliações sejam de suma importância para a correta interpretação dos demais estudos.

Também pôde-se perceber que não foram criadas exceções nos guias, para avaliação de medicamentos antineoplásicos, relativas ao risco-benefício dessas drogas.

A partir das informações obtidas, tentou-se elaborar o item referente aos testes de toxicocinética considerando os aspectos essenciais para a condução desses estudos.

### **5-9 Considerações Finais**

Conforme referências consultadas, pôde-se perceber boa concordância nos guias das agências e instituições internacionais consultados concluindo-se que existe uma possível harmonização internacional para a condução de estudos não clínicos. As divergências encontradas, geralmente, referiam-se a prazos e acompanhamento de estudos necessários à aprovação das substâncias nos países consultados.

Entende-se que a harmonização de guias nacionais, além de sua importância no processo da globalização, contribuirá para uma maior racionalização na utilização de animais, evitando duplicidade de estudos, uso desnecessário de espécies, etc. A harmonização dos estudos, contudo, não deverá impedir a produção científica relativa à criação de novos métodos.



Pôde ser constatado também que apesar da harmonização de recomendações é essencial que, principalmente para os casos de fármacos com novos mecanismos de ação, sejam avaliados se os modelos animais propostos refletem de maneira adequada a relação humano/animal e se conseqüentemente seus dados poderão ser extrapolados para a espécie humana.

Os medicamentos antineoplásicos têm uma peculiaridade relativa à questão risco *versus* benefício, ou seja, toxicidades não permitidas em certas classes terapêuticas, para esses medicamentos, muitas vezes, são aceitáveis devido à gravidade da enfermidade e muitas vezes, também devido à indisponibilidade de terapia existente para a doença. Portanto, esse aspecto foi considerado em muitos guias consultados e conseqüentemente também na construção do guia adaptado ao nosso país.

Como não era propósito do trabalho, a revisão de guias de Boas Práticas de Laboratório, o assunto não foi devidamente explorado. Contudo, a maioria dos guias consultados ressaltou a importância da condução de estudos não clínicos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório, visando assegurar estudos de qualidade, credibilidade e garantir a utilização racional de modelos animais.

Espera-se que o resultado do trabalho possa abrir caminhos para posteriores estudos sobre o assunto e sirva como base para a construção de novos guias para outras classes terapêuticas de importância comercial (relativa a medicamentos altamente consumidos no país) e epidemiológica (relativas a morbi-mortalidades de relevância nacional). Espera-se também que o desenvolvimento de antineoplásicos no Brasil possa ser realizado mediante “regras” transparentes que assegurem a produção de medicamentos de forma mais segura e eficaz.

## 6- RECOMENDAÇÕES À INSTITUIÇÃO (ANVISA)

Visando um melhor aproveitamento do trabalho desenvolvido seguem algumas considerações relevantes para uma boa implementação da proposta elaborada:

- O tema abordado ainda carece de pesquisas e maiores estudos. Os testes não clínicos ainda não são bem conhecidos pela indústria nacional, por nossos pesquisadores e pela própria instituição de regulação. Dessa forma, é interessante que se criem grupos de trabalhos que possam dar continuidade e maior aprimoramento ao estudo apresentado.
- Acredita-se que parcerias com instituições de ensino no país possam ser de grande utilidade para um maior crescimento no campo da pesquisa de estudos não clínicos.
- Para que haja uma regulação e controle eficiente pela Anvisa há necessidade que sua capacidade técnica operacional esteja devidamente instruída com capacitações constantes e de qualidade.
- A presença *in loco* da Anvisa em instituições, empresas e universidades que realizem estes estudos parece ser importante para que se possa ter um melhor conhecimento do panorama atual desses estudos no país. É necessário um conhecimento do quadro atual para que se possa ter uma noção do que se faz, como se faz e onde estão os avanços e limitações nessa área. Baseado em um melhor conhecimento do estado da arte é necessário traçar planos e metas para a melhoria do desenvolvimento de medicamentos no país.
- No caso específico do desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos, parcerias com instituições de interesse como INCA, Ministério da Saúde podem auxiliar no monitoramento e acompanhamento de pesquisas no país. O fomento ao desenvolvimento tecnológico com aprimoramento de todas as fases de P & D, de forma eficiente e racional, pode gerar conhecimentos adequados sobre o perfil de segurança de fármacos em desenvolvimento evitando danos aos pacientes que poderão a vir utilizá-los em Pesquisas Clínicas ou após a liberação para o mercado.
- Ainda se faz necessário estar atento às regulações no âmbito mundial, para que possa internacionalizar aspectos importantes para a P & D de medicamentos, adequando essas normas à realidade de nosso país.
- Espera-se que, dessa maneira, a Anvisa possa contribuir para o processo de P& D no país apoiando pesquisas seguras que tenham como objetivo final o desenvolvimento de medicamentos que possam trazer melhoria de vida e bem estar a pacientes portadores de neoplasias.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BARLOW, S.M., et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 40, n. 2/3, p. 145-191, Feb./Mar. 2002.
- 2- BERKOWITZ, B.A.; KATZUNG, B. G. Basic & Clinical Evaluation of New Drugs. In: KATZUNG, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 2004. Cap. 5.
- 3- BESSET, M.; JACOBSON, S. Torsade de Pointes. **eMedicine Specialties**, New York, May 2006. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/emerg/topic596.htm>>. Acesso em: 11/02/2007.
- 4- BIREME. **DECS. Descritores em Ciências da Saúde**. São Paulo: BIREME/OPAS/OMS; 2006. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>> Acesso em: 01 abr. 2006.
- 5- BRASIL. Lei 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância Sanitária a que Ficam Sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de setembro de 1976.
- 6- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 01 de 13 de junho de 1988. Regulamenta o credenciamento de Centros de Pesquisa no país e recomenda a criação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em cada centro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de junho de 1988.
- 7- BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.
- 8- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. Aprova Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de outubro de 1996.
- 9- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997. Aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área

- temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 1997.
- 10- BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de janeiro de 1999.
- 11- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RDC nº 136 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
- 12- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RDC nº 219 de 20 de setembro de 2004. Aprova o regulamento para elaboração de dossiê para a obtenção de comunicado especial (CE) para a realização de pesquisa clínica com medicamentos e produtos para a saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de setembro de 2004a.
- 13- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RE nº 90 de 16 de março de 2004. Determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004b.
- 14- BRASIL. Ministério da Saúde. **IDB 2005 Brasil - Indicadores de Mortalidade. Mortalidade proporcional por grupos de causas**. Brasília: 2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2005/c04.def>>. Acesso em 15 dez. 2006.
- 15- BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS/RCBP – Registro de Câncer de Base Populacional**. Brasília: s.d. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/dirbd/area/banco/rcbp.htm>>. Acesso em 15 dez. 2006.
- 16- CANADA. Health Canada. **Guidance for Industry Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Carcinogenicity Testing – VICH GL 28**. Canada: 2005. Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/legislation/vet/guide-ld/vich/ich-cih\\_gl\\_28\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/legislation/vet/guide-ld/vich/ich-cih_gl_28_e.html)> Acesso em: 03 nov. 2006.
- 17- CANADA. Health Canada. **Reference Manual for the WHMIS Requirements of the Hazardous Products Act and Controlled Products Regulations - CPR Section 61 - Skin Sensitization [Class D; Division 2, Subdivision B]**. Canada: [200-]a.

- Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/occup-travail/whmis-simdut/ref\\_man/cpr-rpc\\_61\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/occup-travail/whmis-simdut/ref_man/cpr-rpc_61_e.html)>. Acesso em 18 dez. 2006.
- 18- CANADA. Health Canada. **Reference Manual for the WHMIS Requirements of the Hazardous Products Act and Controlled Products Regulations – CPR Section 53 – Teratogenicity and Embryotoxicity [Class D; Division 2, Subdivision A]**. Canada: [200-]b. Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/occup-travail/whmis-simdut/ref\\_man/cpr-rpc\\_53\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/occup-travail/whmis-simdut/ref_man/cpr-rpc_53_e.html)> Acesso em 24 set. 2006.
- 19- COSTA, E.A. Vigilância Sanitária: Proteção e Defesa da Saúde. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 6 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. Cap. 12, p. 357-387.
- 20- DAYAN, A. **The Toxicological Background**. London: s.d. Department of Toxicology, St. Bartholomew`s Hospital Medical College.
- 21- DEPASS, L.R. Alternative Approaches in Median Lethality (LD50) and Acute Toxicity Testing. **Toxicology Letters**, v. 49, n. 2/3, p. 159-170, Dec. 1989.
- 22- DORATO, M.A.; BUCKLEY, L. A. Toxicology in the Drug Discovery and Development Process. In: ENNA, S. J. et al. **Current Protocols in Pharmacology**. New Jersey: Willey InterScience, 1998. Cap. 10.
- 23- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **Note for Guidance on Single Dose Toxicity – 3BS1a**. London: 1987. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>>. Acesso em: 03 set. 2006.
- 24- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **Pharmacokinetics and metabolic studies in the safety evaluation of new medicinal products in animals – 3BS11A**. London: 1994. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2006.
- 25- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products – CPMP/SWP/997/96**. London: 1998. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>> Acesso em: 15 jul. 2006.
- 26- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMEA. **Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity – CPMP/SWP/1042/99**. London: 2000. Disponível em:

- <<http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>> Acesso em: 15 set. 2006.
- 27- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **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. 2006.
- 28- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **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. 2006.
- 29- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **Guideline on Risk Assessment of Medical Products on Human Reproduction and Lactation: From Data to Labeling - EMEA/CHMP/203927/05.** London: 2006a. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>> Acesso em: 05 dez. 2006.
- 30- EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.** London: 2006b. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/htms/aboutus/emeaoverview.htm> Acesso em: 15 dez. 2006.
- 31- FOLB, P.I. **Animal Tests as Predictors of Human Response.** África do Sul: s. d. Department de Pharmacology, University of Cape Town Medical School.
- 32- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry - Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals.** Maryland: 1996. Disponível em: <[www.fda.gov/cder/guidance/pt1.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/pt1.pdf)>. Acesso em: 01 set. 2006.
- 33- 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. 2006.
- 34- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Carcinogenicity Studies with Rodents in Toxicological Principles for the Safety Assesment of Food Ingredients – Redbook 2000.** Maryland: 2006a. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-ivc6.html>>. Acesso em 03 nov. 2006.

- 35- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Guideline nº 116 – Guidance for Industry: Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing VICH GL23 Final Guidance**. Maryland: 2006b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/guide116.htm>>. Acesso em 05 nov. 2006.
- 36- FREIRES, M. G. **Obtenção do *Steady-State* em indivíduos sedentários durante o exercício na bicicleta estacionária**. Goiânia: 2004. Disponível em <<http://www.wgate.com.br/fisioweb/cardio.asp>> Acesso em: 22 nov. 2006.
- 37- FREITAS, C. B.; et al. **Sistema CEPs – CONEP – 9 anos (1996 a 2005)**. Brasília: 2006. Disponível em <<http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/relatorio.doc>> Acesso em: 08 abr.2006.
- 38- GAD, S.C. Da Descoberta aos Ensaio Clínicos: Como Fortalecer a Pesquisa & Desenvolvimento Farmacêutico no Brasil. In: **CURSO INTERNACIONAL**, 2006, São Paulo. São Paulo: Sindusfarma, 2006.
- 39- GERÊNCIA DE MEDICAMENTOS NOVOS, PESQUISA E ENSAIOS CLÍNICOS - GEPEC. **Esclarecimento sobre a posição da Anvisa quanto ao registro de medicamentos antineoplásicos novos**. Brasília: 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registo/antineoplasico.htm>>. Acesso em: 11 fev. 2007.
- 40- GOODYEAR, M. Learning from the TGN1412 Trial – This experience should foster an open culture in medical research. **BMJ**, v. 322, p. 677-678, Mar. 2006. Disponível em: <<http://bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.38797.635012.47>>. Acesso em: 08 set. 2006.
- 41- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 94 p.
- 42- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH. Geneva: s.d. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 10 mar. 2006
- 43- 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/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 15 out. 2006.
- 44- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals & Limit Dose – S1C(R1)**. Geneva:

- 1994a. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
- 45-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/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 dez. 2006.
- 46-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies – S3B.** Geneva: 1994c. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 dez. 2006.
- 47-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals – S2A.** Geneva: 1995a. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 nov. 2006.
- 48-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Guideline on the need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals – S1A.** Geneva: 1995b. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
- 49-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals – S2B.** Geneva: 1997a. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 nov. 2006.
- 50-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals – S1B.** Geneva: 1997b. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 05 nov. 2006.
- 51-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/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 20 set. 2006.
- 52-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **M3 (R1): Maintenance of the ICH Guideline on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals.** Geneva: 2000a. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 01 maio 2006.



- 53-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals – S7A**. Geneva: 2000b. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 25 nov. 2006.
- 54-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **The Non Clínical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals – S7B**. Geneva: 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 05 dez. 2006.
- 55-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. **History and Future of ICH**. Geneva: [199-]. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em 01 abr. 2006.
- 56-LUCCHESI, G. **Globalização e regulação sanitária: os rumos da Vigilância Sanitária no Brasil**. 2001. [Tese de Doutorado]. Escola Nacional de Saúde Pública /FIOCRUZ.
- 57-LUCCHESI, G. A internacionalização da regulamentação sanitária. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 537-555, fev.2003.
- 58-MERCADO COMUM DO SUL – MERCOSUL. Resolução nº 129/96. **Regulamento Técnico sobre a Verificação de Boas Práticas de Pesquisa Clínica**. Fortaleza, 13 de dezembro de 1996.
- 59-MOTA, E.; CARVALHO, D. M. T. Sistemas de Informação em Saúde. In: ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 6 ed. Rio de Janeiro, Medsi, 2003. Cap. 21, p. 605 - 628.
- 60-NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **Cardiotoxicity Study in Cynomolgus Monkeys**. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 1996a.
- 61-NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **Neurotoxicity Study of in Beagle Dogs**. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 1996b.
- 62-NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **Single Dose Toxicity of in Beagle Dogs**. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 1997.
- 63-NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **Cardiotoxicity Study of in Beagle Dogs**. Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003a.

- 64- NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **14 - Day Toxicity Study of in Beagle Dogs.** Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003b.
- 65- NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **28 - Day Toxicity Study of in Beagle Dogs.** Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003c.
- 66- NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **14 - Day Toxicity Study of in Rats.** Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003d.
- 67- NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **28 - Day Toxicity Study of in Rats.** Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003e.
- 68- 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.
- 69- NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **Single Dose Toxicity of in Mice.** Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003g.
- 70- NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **Single Dose Toxicity of in Rats.** Maryland: T&PB, DTP, DCTD NCI Pre-Clinical Toxicology Protocol Master, 2003h.
- 71- NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **NCI Mission Statement.** Maryland: s.d.  
Disponível em: <<http://www.cancer.gov/aboutnci/overview/mission>>. Acesso em: 15 dez. 2006.
- 72- NEWELL, D.R.; et al. The Cancer Research UK experience of pre-clinical toxicology studies to support early clinical trials with novel cancer therapies. **European Journal of Cancer**, London, v. 40, n. 6, p. 899-906, Apr. 2004.
- 73- NISHIOKA, S. A. Regulação da Pesquisa Clínica no Brasil: Passado, Presente e Futuro. **Prática Hospitalar**, São Paulo, Ano VIII, n. 48, p. 17-26, nov./dez. 2006.
- 74- NISHIOKA, S.A.; SÁ, P.F.G. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Pesquisa Clínica no Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 60-62, jan./fev. 2006.
- 75- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Paris: s.d. Disponível em: <[http://www.oecd.org/home/0,2987,en\\_2649\\_201185\\_1\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/home/0,2987,en_2649_201185_1_1_1_1_1,00.html)> Acesso em: 02 abr. 2006.
- 76- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidance Document for Neurotoxicity Test –ENV/JM/MONO (2004) 25.**

- Paris: 2004. Disponível em: [http://apli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/43bb6130e5e86e5fc12569fa005d004c/c631c2551f372e47c1256f580058e823/\\$FILE/JT00174673.DOC](http://apli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/43bb6130e5e86e5fc12569fa005d004c/c631c2551f372e47c1256f580058e823/$FILE/JT00174673.DOC). Acesso em: 30 nov. 2006.
- 77- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Chemicals Testing – Guidelines**. Paris, 2006. Disponível em: [http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html). Acesso em: 01 dez. 2006.
- 78- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **About OECD**. Paris: [2006?]. Disponível em: [http://www.oecd.org/about/0,2337,en\\_2649\\_201185\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/about/0,2337,en_2649_201185_1_1_1_1,00.html). Acesso em: 15 dez. 2006.
- 79- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **OECD Test Guideline 401 will be deleted: A Major Step in Animal Welfare: OECD Reaches Agreement on the Abolishment of the LD50 Acute Toxicity Test**. Paris: s.d. Disponível em: [http://www.oecd.org/document/52/0,2340,en\\_2649\\_201185\\_2752116\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/52/0,2340,en_2649_201185_2752116_1_1_1_1,00.html). Acesso em: 28 ago. 2006.
- 80- OLIVEIRA, G. G.; et al. Os Conceitos e as Técnicas de Ensaios Clínicos. In: OLIVEIRA, G. G. **Ensaios Clínicos Princípios e Prática**. 1 ed. Brasília: Anvisa, 2006. Cap. 10, p.119 – 147.
- 81- OLIVEIRA, G. G.; OLIVEIRA, S. A. H. Os Ensaios Clínicos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 23, p. 160-171.
- 82- PAULO, G. L.; AMARAL, J. R. Desenvolvimento de Novos Medicamentos. In: OLIVEIRA, G. G. **Ensaios Clínicos Princípios e Prática**. 1 ed. Brasília: Anvisa, 2006. Cap. 08, p. 101 – 110.
- 83- PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY RESOURCES. Maryland: s.d. Disponível em: <http://dtp.nci.nih.gov/ptresources.html>. Acesso em: 01 jun. 2006.
- 84- SALMON, S. E.; SARTORELLI, A. C. Chemotherapeutic Drugs In: KATZUNG, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 2004. Cap. 55.
- 85- SAMPAIO FILHO, C. et al. Agentes Antineoplásicos. In: SILVA, P. **Farmacologia** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 107, p. 1055 - 1069.

- 86- SANTANA, O. O. Antiarrítmicos. In: SILVA, P. **Farmacologia** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 64.
- 87- SAUSVILLE E. A.; LONGO, D. L. Principles of Cancer Treatment: Surgery, Chemoterapy, and Biologic Therapy. In: KASPER, D.L. et al. **Harrison`s Principles of Internal Medicine**. 16th ed. New York: McGraw Hill, 2004. Cap. 70.
- 88- SCIENTIFIC GUIDELINES FOR HUMAN MEDICINAL PRODUCTS. London: s.d. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
- 89- SILVA, P. Farmacocinética In: SILVA, P. **Farmacologia** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 5.
- 90- SIMAR, M. R. Coisas do Coração! Morte Súbita! **Boletim Psifavi**, São Paulo: n. 9, nov./dez. 2000, jan. 2001. Disponível em: <[http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/bol\\_psifavi/ed09/2.htm](http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/bol_psifavi/ed09/2.htm)>. Acesso em: 22 nov. 2006.
- 91- STITZEL, K.; CARR, G. **Statistical Basis for Estimating Acute Oral Toxicity Comparison of OECD Guidelines 401, 420, 423 and 425**. North Carolina: 1999. Disponível em: <[iccvam.niehs.nih.gov/methods/udpdocs/udpfm/append/AppO1.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/udpdocs/udpfm/append/AppO1.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2006.
- 92- SWANN, J. P. **History of the FDA**. New York: 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov/oc/history/historyoffda/default.htm>>. Acesso em: 08 abr. 2006.
- 93- THE COUNCIL OF THE EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY. Directive 65/65/EEC of 26 January 1965. On the approximation of provisions laid down by Law, Regulation or Administrative Action relating to proprietary medicinal products. **Official Journal**, Brussels, 09 February 1965.
- 94- THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. Regulation EC N° 726/2004 of 31 March 2004. Application of the “Sunset Clause” in the Review of the Pharmaceutical Legislation to Medicinal Products Authorised before Directives 2004/17/EC and 2004/28/EC and Regulation (EC) N° 726/2004 Start to Aply. **Official Journal**, Brussels, 03 October, 2005.
- 95- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Rockville: s.d. Disponível em: <http://www.fda.gov/>. Acesso em: 01 mar. 2006.

- 96- WEINBERG, W.C., et al. Development and regulation of monoclonal antibody products: Challenges and opportunities. **Cancer and Metastasis Reviews**, New York, v. 24, n. 4, p. 569-584, Dec. 2005.
- 97- WHITEHEAD, A.; STALLARD, N. Opportunities for Reduction in Acute Toxicity Testing via Improved Design. **ATLA**, Reading, v.32, n. 2, p. 73–80, June 2004.
- 98- 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 mar. 2006.
- 99- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **WHO Cancer Control Programme**. Geneva:[200-]. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em 15 dez. 2006.
- 100- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **About WHO**. Geneva: s.d. Disponível em: <<http://www.who.int/about/en/index.html>> Acesso em: 15 dez. 2006.

## 8- ANEXOS

### 8-1 Como encontrar e obter os guias referenciados:

| Estudos                              | EMEA  | FDA  | ICH  | NCI   | OECD  | WHO |
|--------------------------------------|---|--|--|---|---|-----|
| <b>Toxicidade Aguda</b>              | Note for Guidance on Single Dose Toxicity.<br>Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a>   | Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals<br>Disponível em <a href="http://www.fda.gov/cder/Guidance/pt1.pdf">www.fda.gov/cder/Guidance/pt1.pdf</a> | -  | Single Dose Toxicity of in Mice / Single Dose Toxicity of in Rats / Single Dose Toxicity of in Beagle Dogs.<br>Disponíveis por solicitação via e-mail <sup>(1)</sup>  | 420, 423 e 425 –<br>Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup>      | -   |
| <b>Toxicidade de Doses Repetidas</b> | Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity.<br>Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a> | -  | Duration Of Chronic Toxicity Testing In Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing) – S4<br>disponível em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a> | 14-Day Toxicity Study of in Beagle Dogs / 14-Day Toxicity Study of in Rats / 28-Day Toxicity Study of in Beagle Dogs / 28-Day Toxicity Study of in Rats.<br>Disponíveis por solicitação via e-mail <sup>(1)</sup> | 407, 408, 409 e 452 –<br>Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup> | -   |

| Estudos                       | EMA  | FDA   | ICH   | NCI | OECD   | WHO |
|-------------------------------|--|---|---|-----|--|-----|
| <b>Toxicidade Reprodutiva</b> | Guideline on Risk Assessment of Medical Products on Human Reproduction and Lactation: From Data to Labeling – DRAFT. Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a> | Integration of Study Results to Assess Concerns about Human Reproductive and Developmental Toxicities – DRAFT disponível em <a href="http://www.fda.gov/ohrtms/DOCKETS/98fr111301a.htm">http://www.fda.gov/ohrtms/DOCKETS/98fr111301a.htm</a> | Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2) Disponível em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a>  | -   | 414, 415 e 416 – Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup>          | -   |
| <b>Genotoxicidade</b>         | -  | -   | 1- Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals – S2A<br>2- Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals – S2B<br>Disponíveis em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a> | -   | 471, 473, 474, 475, 476 – Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup> | -   |

| <b>Estudos</b>           | <b>EMA</b>  | <b>FDA</b>  | <b>ICH</b>   | <b>NCI</b> | <b>OECD</b>   | <b>WHO</b> |
|--------------------------|---|---|--|------------|---|------------|
| <b>Tolerância Local</b>  | Note for Guidance on Non Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products – Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a> | -   | -  | -          | 406, 429 – Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup> | -          |
| <b>Carcinogenicidade</b> | Note for Guidance on Carcinogenic Potencial – Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a>                                     | Carcinogenicity Studies with Rodents <i>in</i> Toxicological Principles for the Safety Assesment of Food Ingredients – Redbook 2000 – Disponível em <a href="http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html">http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html</a> | 1- Guideline on the need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals – S1A.<br>2- Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals – S1B.<br>3-Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals & Limit Dose – S1C(R1)<br>Disponíveis em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a> | -          | 451, 453 – Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup> | -          |



| Estudos  | EMEA   | FDA | ICH   | NCI  | OECD   | WHO |
|--|--|-----|---|--|--|-----|
| <b>Interesse na avaliação da Segurança Farmacológica</b> | -  | -   | 1-Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals – S7A<br>2- The Non Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals – S7B<br>Disponíveis em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a> | Cardiotoxicity Study of in Beagle Dogs / Cardiotoxicity Study in Cynomolgus Monkeys / Neurotoxicity Study of in Beagle Dogs. Disponíveis por solicitação via e-mail <sup>(1)</sup> | 424 – Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup> | -   |
| <b>Farmacocinética/ Toxicocinética</b>                   | Pharmacokinetics and Metabolic Studies in the Safety Evaluation of New Medicinal Products in Animals – Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a> | -   | 1- Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies – S3A<br>2-Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies – S3B<br>Disponíveis em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a>                         | Pharmacokinetics and Dose Range-Finding Study of in Beagle Dogs. Disponíveis por solicitação via e-mail <sup>(1)</sup>   | 417 – Aquisição mediante compra <sup>(2)</sup> | -   |

| <b>Estudos</b>                          | <b>EMEA</b>   | <b>FDA</b> | <b>ICH</b>   | <b>NCI</b> | <b>OECD</b> | <b>WHO</b>   |
|---|---|------------|--|------------|-------------|--|
| <b>Específicos para Antineoplásicos</b> | Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products – Disponível em <a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm">http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/nonclinical.htm</a> |            |  |            |             | -  |
| <b>Global</b>                           | -   | -          | M3(R1): Maintenance of the ICH Guideline on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals Disponível em <a href="http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html">http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html</a> | -          | -           | HANDBOOK – Non Clinical Safety Testing Disponível em <a href="http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm">http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm</a> |

(1) – Disponíveis a partir de solicitação via e-mail: [tpb@ntpax2.ncifcrf.gov](mailto:tpb@ntpax2.ncifcrf.gov)

(2) – Disponíveis para compra em: <http://new.sourceoecd.org/vl=9436836/cl=17/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/contp1-1.htm>

## 8-2 Quadro comparativo das regulações de abrangência nacional

| Estudos                                 | 01/88<br>CNS  | 129/96<br>Mercosul  | 251/97<br>CNS   | 219/04<br>ANVISA | RE 90/04<br>ANVISA   |
|---|---|---|---|------------------|--|
| <b>Citação de Não/Pré Clínicos</b>      | Sim (Capítulo VII)  | Sim (Capítulo X)  | Sim   | Sim              | Sim  |
| <b>Toxicidade de Dose Única (Aguda)</b> | 3 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 2 vias (proposta para estudo e via que assegure absorção do fármaco).<br>Estimativa de Índice de Letalidade<br>Cita parâmetros a serem avaliados. | 3 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 2 vias (proposta para estudo e via que assegure absorção do fármaco).<br>Cita parâmetros a serem avaliados. | 3 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 2 vias (proposta para estudo e via que assegure absorção do fármaco). | -                | Uma espécie de mamífero<br>Via de administração: proposta para o estudo<br>Estimativa de DL50<br>Cita parâmetros a serem avaliados                                     |
| <b>Toxicidade de Doses Repetidas</b>    | 3 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 2 vias (proposta para estudo e via que assegure absorção do fármaco). Cita parâmetros a serem avaliados   | 2 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 1 via (proposta para estudo)<br>Três grupos de doses<br>Cita parâmetros a serem avaliados.                  | 3 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 2 vias (proposta para estudo e via que assegure absorção do fármaco). | -                | 2 Espécies Animais, sendo uma mamífera não roedora<br>Via de Administração: 1 via (proposta para estudo)<br>Três grupos de doses<br>Cita parâmetros a serem avaliados. |
| <b>Situação</b>                         | Revogada  | Em vigor  | Em vigor  | Em vigor         | Em vigor   |

| <b>Estudos</b>   | <b>01/88<br/>CNS</b> | <b>129/96<br/>Mercosul</b>   | <b>251/97<br/>CNS</b> | <b>219/04<br/>ANVISA</b> | <b>RE 90/04<br/>ANVISA</b>  |
|--|----------------------|--|-----------------------|--------------------------|---|
| <b>Toxicidade Reprodutiva</b>                            | Somente Citação      | Embriotoxicidade: 2 Espécies (Uma não roedora) Três níveis de dose   | Somente Citação       | -                        | -   |
| <b>Genotoxicidade</b>                                    | Somente Citação      | Avaliação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com e sem ativação metabólica   | Somente Citação       | -                        | Avaliação <i>in vitro</i> da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de danos a cromossomas de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo. Avaliação <i>in vivo</i> do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (Teste de Micronúcleo) |
| <b>Tolerância Local</b>                                  | -                    | Somente Citação  | -                     | -                        | Somente Citação   |
| <b>Carcinogenicidade</b>                                 | Somente citação      | Deverão ser demonstradas mediante provas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>  | Somente Citação       | -                        | -   |
| <b>Interesse na avaliação da Segurança Farmacológica</b> | -                    | -  | -                     | -                        | -   |
| <b>Farmacocinética/ Toxicocinética</b>                   | Somente Citação      | Farmacocinética com dose única e depois de administração repetida<br>Distribuição em animais normais e gestantes<br>Biotransformação/Excreção<br>Interação Farmacocinética | -                     | -                        | -   |
| <b>Situação</b>  | <b>Revogada</b>      | Em vigor   | Em vigor              | Em vigor                 | Em vigor  |

### 8-3 Quadro da síntese das classificações de medicamentos antineoplásicos

| Classe                        | Mecanismo de Ação  | Exemplos   |
|-------------------------------|--|--|
| Agentes Alquilantes           | Compostos capazes de substituir um átomo de hidrogênio por um radical alquila em um componente celular. Atuam em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico.   | Mostardas Nitrogenadas: Mecloretamina, Ciclofosfamida/Ifosfamida, Melfalana, Clorambucila.<br>Nitrosuréis: Carmustina, Lomustina, Semustina.<br>Triazenos: Dacarbazina.  |
| Agentes Antimetabólitos       | Agem sobre o metabolismo das células em proliferação. Vias bioquímicas mais acessíveis aos antimetabólitos: síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos e vias de replicação celular.   | Antagonistas do Folato: Metrotexato, Raltitrexato, Pemetrexato.<br>Análogos da Pirimidina: 5-Fluorouracila, Capecitabina, Gemcitabina, Citarabina.<br>Análogos da Purina: Mercaptopurina, Fludarabina, Cladribina. |
| Antibióticos                  | Grupo de substâncias com estrutura química variada que, apesar de interagirem com o DNA e inibirem a síntese desse ácido ou de proteínas, não agem especificamente sobre uma fase específica do ciclo celular. Possuem em comum, anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a produção de radicais livre reativos. Podem também associar novos mecanismos de ação, como alquilação, inibição enzimática ou inibição da função do DNA por intercalação. | Antraciclina: Doxorrubicina, Daunorrubicina, Idarrubicina.<br>Bleomicina, Mitomicina.  |
| Inibidores das Topoisomerasas | Agem inibindo a topoisomerase que são enzimas intracelulares que controlam e modificam o estado topológico do DNA. As topoisomerasas são diferenciadas em tipos I e II de acordo com seus mecanismos e propriedades físicas.   | Inibidores da topoisomerase I: Irinotecano, Topotecano.<br>Inibidores da topoisomerase II: Etoposídeo, Teniposídeo.  |

| <b>Classe</b>                        | <b>Mecanismo de Ação</b>   | <b>Exemplos</b>  |
|--------------------------------------|--|--|
| Agentes Inibidores de Microtúbulos   | Agem inibindo microtúbulos que são polímeros de tubulina responsáveis pela formação do citoesqueleto celular e do fuso mitótico. Estão também envolvidos em outras funções celulares não relacionadas diretamente à mitose, como transporte, secreção e adesão celular.                              | Alcalóides da Vinca: Vimblastina, Vincristina.<br>Taxanos: Paclitaxel, Docetaxel.  |
| Agentes derivados da Platina         | Reagem na posição N7 da Guanina e Adenina do DNA através de pontes mono e bifuncionais que impedem a síntese de proteínas, RNA e DNA.  | Cisplatina, Carboplatina, Oxaliplatina.  |
| Agentes Hormonais                    | Utilizados em neoplasias que sofrem estímulo proliferativo ou antiproliferativo na dependência de fatores hormonais.   | Moduladores do Receptor Estrogênico:<br>Tamoxifeno.<br>Inibidores/ Inativadores da Enzima Aromatase:<br>Anastrozol, Letrozol, Exemestano, Fulvestranto, Eramustina.<br>Moduladores do Receptor Androgênico:<br>Bicalutamida, Flutamida, Nilutamida.<br>Antagonistas do Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante (LHRH): Goserelina. |
| Agentes Inibidores da Tirosinacinase | Atuam inibindo a Tirosinacinase. As proteínas cinases são enzimas que transferem fosfatos do ATP para aminoácidos específicos nas suas proteínas-substrato. A fosforilação dessas enzimas ativa vias que desempenham papel fundamental em processos como crescimento, diferenciação e morte celular. | Imatinibe<br>Bortezomide   |
| Anticorpos Monoclonais               | Anticorpos humanos ou quiméricos (murino/humano) com alta especificidade, dirigidos contra terapias alvo.  | Gentuzumabe  |

Fontes: SALMON & SARTORELLI (2004); SAMPAIO FILHO (2006); SAUSVILLE & LONGO (2004).