

Avaliação do potencial mutagênico de agrotóxicos

Guia nº 66/2023 – versão 2



Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

2024

Avaliação do potencial mutagênico de agrotóxicos

VIGENTE A PARTIR DE 23/12/2024

Este Guia expressa o entendimento da Anvisa sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pelos marcos legislativo e regulatório da Agência.¹

Trata-se de instrumento regulatório não normativo, de caráter recomendatório e não vinculante, sendo, portanto, possível o uso de abordagens alternativas às proposições aqui dispostas, desde que compatíveis com os requisitos relacionados ao caso concreto. A inobservância ao conteúdo deste documento não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação.

¹[Portaria nº 162, de 12 de março de 2021](#), que dispõe sobre as diretrizes e os procedimentos para melhoria da qualidade regulatória na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

²A fim de garantir maior transparência ao processo de elaboração dos instrumentos regulatórios editados pela Anvisa, esclarecemos que os nomes dos responsáveis pelas contribuições (pessoas físicas e jurídicas) são considerados informações públicas e serão disponibilizados de forma irrestrita nos relatórios e outros documentos gerados a partir dos resultados deste Guia. Já o e-mail e o CPF dos participantes, considerados informações sigilosas, terão seu acesso restrito aos agentes públicos legalmente autorizados e às pessoas a que se referem tais informações, conforme preconiza o artigo 31, §1º, inciso I da Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011. Outras informações que venham a ser consideradas sigilosas pelos participantes poderão ser apensadas em campo específico no formulário eletrônico.

Copyright©2024. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. A reprodução parcial ou total deste documento por qualquer meio é totalmente livre, desde que citada adequadamente a fonte. A reprodução para qualquer finalidade comercial está proibida.

SUMÁRIO

1.	ESCOPO.....	5
2.	INTRODUÇÃO	5
3.	BASE LEGAL	7
4.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGROTÓXICOS POR AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS.....	10
4.1.	AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA (USEPA).....	10
4.2.	AUTORIDADE EUROPEIA PARA SEGURANÇA ALIMENTAR (EFSA)	11
5.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGROTÓXICOS PELA ANVISA	11
6.	USO DE AVALIAÇÕES DE AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS COMO PARTE DA AVALIAÇÃO DO PESO DA EVIDÊNCIA.....	17
7.	ESTRATÉGIA INTEGRADA DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE	18
7.1.	ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE	18
7.1.1.	Dados não-experimentais (métodos in silico).....	18
7.1.2.	Dados experimentais	19
7.1.2.1.	Ensaio in vitro.....	22
I.	Ensaio in vitro de mutação gênica.....	23
a)	Teste de mutação reversa em bactérias (Teste de Ames) – Diretriz OECD 471	23
b)	Teste de mutação gênica em células de mamíferos usando os genes Hprt ou xprt – Diretriz OECD 476	26
c)	Teste de mutação gênica em células de mamíferos usando o gene Timidina quinase – Diretriz OECD 490.....	30
II)	Ensaio in vitro de danos cromossômicos	34
a)	Teste de aberração cromossômica em células de mamíferos – Diretriz OECD 473	34
b)	Teste de micronúcleo em células de mamíferos – Diretriz OECD 487.....	37
7.2.2.2	Ensaio in vivo	41
I.	Ensaio in vivo de mutação gênica.....	42
a)	Ensaio de mutação gênica em células germinativas e somáticas de roedores transgênicos – Diretriz OECD 488	42
b)	Ensaio de mutação no gene Pig-a em eritrócitos de mamíferos – Diretriz OECD 470	47
II.	Ensaio in vivo de danos cromossômicos	51
a)	Teste de micronúcleo em eritrócito de mamíferos – Diretriz OECD 474.....	51
b)	Teste de Aberração Cromossômica na Medula Óssea de Mamíferos – Diretriz OECD 475	55
c)	Teste de dominante letal em roedores – Diretriz 478	58
d)	Teste de aberração cromossômica em espermatogônia de mamíferos – Diretriz OECD 483	62
e)	Ensaio de erro de translocação herdável em camundongos – Diretriz OECD 485.....	65
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
9.	LISTA DE ABREVIATURAS	30

10. REFERÊNCIAS.....	71
-----------------------------	-----------

1. ESCOPO

Este Guia fornece orientações sobre a avaliação conduzida pela Anvisa acerca do potencial mutagênico dos ingredientes ativos (IA) de agrotóxicos, bem como dos produtos técnicos e formulados. O objetivo deste Guia é indicar os princípios fundamentais dessa avaliação e detalhar os principais estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* considerados relevantes na identificação de mutações gênicas e aberrações cromossômicas, a fim de melhor caracterizar esse desfecho toxicológico. Dessa forma, a Anvisa dá transparência quanto a parâmetros importantes na apresentação desses estudos, quais sejam: qualidade da descrição do estudo, desenho experimental (número de organismos-teste, doses, controle negativo e positivo, avaliação cega, período de exposição, desfechos avaliados, dentre outros), uso de dados fornecidos por abordagens não-animais, condução do estudo (solubilidade, pH, osmolaridade, citotoxicidade) e adequada análise e interpretação dos resultados. E, por fim, esclarece a adoção de uma análise baseada no peso da evidência (*Weight of Evidence* – WoE), efetuada com base em critérios também adotados por diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão.

Na reanálise de ingredientes ativos de agrotóxicos, são considerados os dados e evidências disponíveis, não sendo mandatória a observação de outros dados como pré-requisito para a tomada de decisão regulatória. Embora este guia busque detalhar a avaliação e uso da maior parte das evidências que podem estar disponíveis, considera-se que a tomada da decisão regulatória independe da disponibilização de mais dados, sendo possível alcançá-la com a informação existente no momento da avaliação.

É importante ressaltar que as orientações fornecidas no referido guia se limitam às etapas necessárias para identificação e caracterização do perigo, não abrangendo as demais etapas de avaliação do risco para os seres humanos.

2. INTRODUÇÃO

Alterações genéticas em células germinativas e somáticas estão associadas a graves efeitos na saúde humana, que podem se manifestar muito tempo após a exposição. Ainda, os efeitos deletérios podem ser originados de dano ao DNA em uma única célula à baixa exposição e, ao invés de destruir essa célula atingida, a alteração genética pode ser capaz de gerar um fenótipo que não apenas persiste, mas que pode ser amplificado à medida que as células se dividem. As mutações em células germinativas são aquelas que ocorrem nos óvulos ou espermatozoides (células germinativas) e, portanto, podem ser transmitidas aos descendentes. Elas podem levar a abortos espontâneos, infertilidade, malformações ou danos herdáveis pelas gerações subsequentes, resultando em doenças genéticas. Já as mutações somáticas ocorrem em células diferentes das células germinativas e não podem ser transmitidas à próxima geração. Esse tipo de mutação pode causar câncer, caso ocorra em proto-oncogenes, genes supressores de tumor ou em genes de reparo de danos ao DNA. Por essa razão, evidências de atividade mutagênica – avaliadas a partir da abordagem do WoE, conforme será aprofundado no item 5 deste guia – podem ser indicativas de um potencial

carcinogênico associado à substância em estudo. O acúmulo de danos ao DNA em células somáticas também pode estar associado ao desenvolvimento de várias outras doenças genéticas e tem sido relacionado a condições degenerativas, como: aceleração do envelhecimento, disfunção imune, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (OECD, 2016).

É importante destacar, a fim de se obter uma maior compreensão da legislação brasileira, as diferenças entre efeitos mutagênicos e genotóxicos. A mutagenicidade resulta em eventos que alteram o DNA e/ou o número ou estrutura cromossômica, os quais são irreversíveis e, portanto, capazes de serem transmitidos para gerações celulares subsequentes, se não forem letais para a célula em que ocorrem; ou para a prole, caso ocorram em células germinativas. Ou seja, incluem-se no conceito de mutações: 1) alterações num único par de bases; em genes parciais, únicos ou múltiplos; ou em cromossomos; 2) quebras nos cromossomos que resultam em deleção, duplicação ou rearranjo estável (transmissível) de segmentos cromossômicos; 3) uma alteração (ganho ou perda) no número de cromossomos (isto é, aneuploidia), resultando em células que não possuem um múltiplo exato do número haplóide; e, 4) alterações no DNA resultantes da recombinação mitótica. Os resultados positivos nos testes de mutagenicidade podem ser causados por compostos químicos que não atuam diretamente no DNA, como ocorre com a aneuploidia causada por inibidores da topoisomerase ou com mutações gênicas causadas pela inibição metabólica da síntese de nucleotídeos (OECD, 2016).

Genotoxicidade, por sua vez, é um termo mais amplo, no qual está incluso a mutagenicidade acima descrita, mas também outros danos ao DNA – os quais podem ser mutagênicos, mas também podem ser revertidos pela reparação do DNA ou outros processos celulares. Portanto, efeitos genotóxicos podem ou não resultar em alterações permanentes na estrutura ou informação contida em uma célula sobrevivente ou em sua progênie. Consequentemente, os ensaios de genotoxicidade incluem aqueles que avaliam danos induzidos ao DNA (mas não evidências diretas de mutação), por meio de desfechos como síntese não programada de DNA, quebras de fita de DNA (por exemplo, ensaio cometa) e formação de adutos de DNA, ou seja, ensaios de danos primários ao DNA (OECD, 2016).

Ou seja, enquanto os ensaios de genotoxicidade são capazes de mensurar eventos que não são, necessariamente, transmissíveis de célula a célula ou de geração a geração e podem ser transitórios ou resultar em morte celular; os de mutagenicidade, por outro lado, mensuram eventos persistentes que não podem ser reparados (USEPA, 2012). Por essa razão, apenas os resultados provenientes de estudos destinados à avaliação do potencial mutagênico das substâncias – detalhados nos itens posteriores, são utilizados para a classificação quanto à mutagenicidade. Os estudos de genotoxicidade auxiliam no entendimento dos efeitos adversos, mas não são suficientes para determinar efeitos hereditários (Dearfield et al., 2002). Nesse contexto, embora os efeitos genotóxicos possam ser valiosos na interpretação dos resultados de ensaios de mutagenicidade, eles são considerados como dados suplementares (FAO/WHO, 2020).

Com relação aos dados obtidos em humanos, para serem incluídos na análise do WoE,

os estudos epidemiológicos devem ter seu desenho experimental criticamente avaliado quanto aos seguintes fatores: adequabilidade dos controles ou grupos de comparação usados, qualidade das avaliações de exposição, possibilidade de coexposições, presença de vieses e fatores de confundimento (ECHA, 2017). Tendo em vista que a mutagenicidade consiste em um mecanismo associado aos desfechos de carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva, recomenda-se a consulta aos guias específicos para avaliação toxicológica desses desfechos, a fim de se obter um maior detalhamento da avaliação de estudos epidemiológicos como parte do WoE.

3. BASE LEGAL

O arcabouço legal que embasa as considerações aqui apresentadas são: a Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023; a RDC nº 294, de 29 de julho de 2019; a RDC nº 296, de 29 de julho de 2019; e a RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

A Lei nº 14.785, de 2023 revogou a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Entre as alterações legais destaca-se a proibição do registro de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental e afins que apresentem risco inaceitável para os seres humanos ou para o meio ambiente, por permanecerem inseguros, mesmo com a implementação das medidas de gestão de risco. Adicionalmente, o termo reavaliação é substituído por reanálise em adequação ao disposto na nova Lei.

A RDC nº 294, de 29 de julho de 2019, em seu Art. 27, esclarece o conceito de mutagenicidade e, com base no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos – GHS, considera um produto mutagênico quando causa mutações em células germinativas de seres humanos ou quando há evidências suficientes, com base no peso da evidência, sobre o potencial mutagênico do produto, a partir das quais se presume que tal produto causa mutações em células germinativas de seres humanos. Ainda, um produto mutagênico em células somáticas é considerado mutagênico em células germinativas, a não ser que exista evidência suficiente demonstrando que ele não induz mutação em células germinativas de mamíferos. Essa resolução também detalha os estudos a serem apresentados nas análises de produto técnico (item 8, Seção 2 do Anexo I), produto formulado (item 7, Seção 1 do Anexo II) e produto técnico equivalente (Seção 2 do Anexo III).

Para produtos técnicos, devem ser apresentados estudo de mutação gênica em células bacterianas, estudo de mutação gênica *in vitro* em células de mamíferos, estudo de dano cromossômico *in vitro* em células de mamíferos e *in vivo* em células somáticas. Não é necessária a apresentação de estudos adicionais quando os resultados de todos esses estudos forem negativos. Adicionalmente, deverá ser conduzido um estudo para investigar a indução de mutação gênica *in vivo*, quando qualquer um dos estudos *in vitro* de mutação gênica apresentar resultado positivo ou equívoco.

Para produtos formulados, sempre devem ser entregues estudo de mutação gênica em células bacterianas e estudo de dano cromossômico *in vitro* em células de mamíferos. Não é necessária a apresentação de estudos adicionais quando os resultados desses dois estudos

forem negativos. Entretanto, quando o estudo de mutação gênica em células bacterianas apresentar resultado positivo ou equívoco (interpretado como igualmente provável de que seja positivo ou negativo), deverá ser conduzido um estudo adicional para investigar a indução de mutação gênica *in vivo*. Similarmente, quanto à investigação do desfecho de dano cromossômico, deverá ser conduzido um estudo adicional para investigar danos cromossômicos *in vivo* quando o estudo *in vitro* de dano cromossômico apresentar resultado positivo ou equívoco. Um maior aprofundamento dos critérios adotados para considerar um resultado como positivo, negativo ou equívoco pode ser verificado no item 7, especificamente nos subitens que abordam a análise e interpretação dos resultados de cada estudo individualmente.

Quando qualquer um dos estudos *in vivo* usando células somáticas apresentar resultado positivo, será considerado que os produtos técnicos e formulados também são potenciais mutágenos de células germinativas. Entretanto, estudos de mutagenicidade em células germinativas poderão ser conduzidos para demonstrar se o mutágeno em células somáticas é ou não um mutágeno em células germinativas.

Essa abordagem para a entrega de estudos destinados à avaliação do potencial mutagênico está alinhada à estratégia utilizada por outras agências regulatórias internacionais, com base no WoE. Assim, é dado maior peso aos estudos *in vivo*, que necessariamente devem ser avaliados quando os estudos *in vitro* são positivos ou equívocos. Caso a substância cause mutação somática, adicionalmente deve-se apresentar estudo em células germinativas. Na ausência deste, a substância será considerada também mutagênica em células germinativas, a menos que existam evidências de que as gônadas não são alcançadas pela substância teste. Ou seja, estudos de mutagenicidade em células germinativas podem ser conduzidos para demonstrar se o mutágeno em células somáticas é ou não um mutágeno em células germinativas. Porém, não são necessários estudos adicionais em células germinativas quando todos os estudos de mutagenicidade apresentarem resultados negativos, a menos que exista evidência de que a substância teste possa alcançar as células germinativas e causar alterações nas gônadas ou células germinativas.

Além disso, a RDC nº 294/2019 estabelece a classificação toxicológica dos ingredientes ativos de agrotóxicos, em função da mutagenicidade, nas Categorias 1A, 1B ou 2 (Seção 4 do Anexo IV), de acordo com a avaliação baseada no WoE. Essa classificação está detalhada no Quadro 1. Os produtos que não se enquadram em nenhuma dessas categorias não são classificados quanto à mutagenicidade.

Quadro 1. Classificação toxicológica em função da mutagenicidade.

CATEGORIAS		CRITÉRIOS
Categoria 1A		
Produto conhecido por induzir mutações em células germinativas de seres humanos.		Essa classificação é baseada em evidência positiva a partir de estudos epidemiológicos com seres humanos.

Categoria 1B

Produto que presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos.

Essa classificação é baseada em:

- resultados positivos em estudos que mostram efeitos mutagênicos em células germinativas de seres humanos, sem a demonstração de transmissão à prole; ou
- resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células germinativas de mamíferos; ou
- resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células somáticas de mamíferos, em combinação com evidência de que a substância tem o potencial de causar mutações em células germinativas; ou
- resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células somáticas de mamíferos, na ausência de estudo de mutagenicidade *in vivo* em células germinativas.

Categoria 2

Produto que mostra indicação de causar efeitos genotóxicos, mas sem evidência de causar mutagenicidade em células germinativas.

Essa classificação é baseada em:

- resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células somáticas de mamíferos, em combinação com resultados negativos de estudos de mutagenicidade em células germinativas *in vivo*; ou
- resultados positivos de estudos de genotoxicidade não mutagênicos *in vivo* em células somáticas que são suportados por resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vitro*; ou
- resultados positivos em estudos *in vitro* de mutagenicidade em células de mamíferos em combinação com evidência de relação estrutura-atividade da substância-teste com mutágenos conhecidos em células germinativas.

Adicionalmente, a RDC nº 296/2019 estabelece os dados de rotulagem – pictograma GHS, palavra de advertência e frase de perigo – de acordo com a mutagenicidade, conforme detalhado no Quadro 2.

Quadro 2. Classificação e dados de rotulagem em função da mutagenicidade.

CLASSIFICAÇÃO		ROTULAGEM	
CATEGORIA	Pictograma GHS	Palavra de advertência	Frase de Perigo
CATEGORIAS 1A E 1B		Perigo	Pode provocar defeitos genéticos (indicar a via de exposição, se for conclusivamente comprovado que nenhuma outra via de exposição provoca o dano).
CATEGORIA 2		Atenção	Suspeito de provocar defeitos genéticos (descrever a via de exposição, se for conclusivamente comprovado que nenhuma outra via de exposição provoca o dano).

4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGROTÓXICOS POR AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS

As agências reguladoras historicamente têm utilizado as informações de genotoxicidade, como parte da avaliação do WoE, para se concluir quanto ao Modo de Ação (*Mode of Action* - MoA) e ao potencial carcinogênico de substâncias químicas. As informações referentes à mutagenicidade em células germinativas e somáticas também são importantes na avaliação de outros efeitos adversos, especialmente aqueles relacionados ao desenvolvimento embrionário (FAO/WHO, 2020).

Embora seja a mutagenicidade um potencial evento-chave de um MoA relacionado a outros desfechos (câncer ou toxicidade para o desenvolvimento), as principais agências regulatórias, assim como a Anvisa, também consideram as mutações hereditárias um desfecho regulatório em si, pois mutações em células germinativas podem ser herdadas e contribuir para doenças genéticas nas futuras gerações (FAO/WHO, 2020). Mutações em células somáticas e germinativas são causas de várias doenças como câncer, anemia falciforme e doenças neurológicas (FAO/WHO, 2020). O banco de dados de mutações genéticas humanas (Human Gene Mutation Database – HGMD®) inclui mais de 300 mil mutações e polimorfismos que causam ou estão associados a doenças humanas hereditárias (Stenson et al. 2020).

Ainda, cabe ressaltar que a Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA), a Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA) e a Agência Europeia de Produtos Químicos (*European Chemical Agency* - ECHA) estão comprometidas com os princípios internacionalmente reconhecidos dos 3Rs - substituição, redução e refinamento dos testes em animais e promovem métodos de avaliação de risco (AR) que minimizam a utilização de animais e buscam abordagens alternativas sempre que possível (EC nº 283/2013; USEPA, 2013).

4.1. AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA (USEPA)

Na análise de mutagenicidade conduzida pela USEPA, diferentes fatores são considerados para alcançar uma conclusão sobre o potencial mutagênico das substâncias, tais como: os tipos de desfechos (mutação gênica e aberração cromossômica), sensibilidade e valor preditivo dos ensaios, quantidade de ensaios para caracterização de cada desfecho e consistência nos resultados entre os diferentes ensaios e espécies (USEPA, 1986). A USEPA considera que estudos *in vivo* têm maior peso para determinar o potencial mutagênico, pois nos ensaios *in vitro* não se considera a resposta do organismo ao dano causado pelo agente tóxico, ou seja, a sua capacidade de desintoxicação. A USEPA considera ainda que vários ensaios de genotoxicidade apenas detectam efeitos que podem ser reparados no organismo e, consequentemente, podem não acarretar danos hereditários. Por essa razão, assim como efetuado pela Anvisa, estudos de genotoxicidade isoladamente não são

considerados suficientes na análise do WoE, para se alcançar uma conclusão sobre o potencial mutagênico de substâncias.

4.2. AUTORIDADE EUROPEIA PARA SEGURANÇA ALIMENTAR (EFSA)

A EFSA também baseia suas análises em ensaios que avaliem desfechos relacionados à mutagenicidade (aberração estrutural, aberração numérica e mutações pontuais). Inicialmente, são requeridos ensaios *in vitro* e, havendo resultados positivos, equívocos ou inconclusivos, pode ser necessária a realização de ensaios *in vivo*, os quais devem avaliar os mesmos desfechos dos ensaios *in vitro*, a fim de confirmar a mutagenicidade da substância. Entretanto, nessa etapa, alguns ensaios de genotoxicidade podem ser aceitos – ensaio cometa e de síntese não programada de DNA – pois são considerados suficientes para comprovar os resultados obtidos *in vitro*. Vale ressaltar que o ensaio de síntese não programada de DNA é limitado, pois se aplica a substâncias com efeitos genotóxicos específicos no fígado, além de ser pouco prático e possuir sensibilidade questionável (EFSA, 2011). Ou seja, a agência europeia não recomenda a condução desse tipo de ensaio em avaliações futuras, mas somente a utilização dos dados de estudos existentes em caso de reavaliações (EC nº 440/2008), sendo a confiabilidade e significância desses resultados cuidadosamente avaliadas seguindo a abordagem de WoE, antes de considerar a solicitação de testes *in vivo* adicionais (Hardy et al., 2017).

Com relação à classificação do perigo das substâncias quanto à mutagenicidade, a União Europeia adotou, na normativa EC nº 1107/2009, a classificação do GHS (EU, 2019). Ainda, a EFSA possui restrição quanto à aprovação de ingredientes ativos de agrotóxicos mutagênicos. Isto é, de acordo com a normativa europeia (EC nº 1107/2009), é proibida a aprovação de substâncias que se enquadrem nesse aspecto toxicológico.

Apesar da proibição de agrotóxicos mutagênicos na Europa, é necessário o estabelecimento de tolerâncias de importação para resíduos mesmo quando um agrotóxico não tem o seu uso permitido, conforme regulamentado pela normativa EC nº 396/2005. Assim, embora o uso de um agrotóxico mutagênico não esteja permitido na Europa, pode ser mandatória a determinação de valores de referência toxicológicos para uma AR dietético, mesmo que apenas indicativa do risco e não necessariamente conclusiva. A EFSA fornece orientações (EC nº 283/2013; EFSA, 2016) sobre a definição de resíduos para AR dietético e instruções para a identificação e caracterização de perigo para metabólitos utilizando métodos como (Q)SAR (*Quantitative Structure–Activity Relationship Model* - Modelo da Relação Quantitativa Estrutura-Atividade), perfil genotóxico por *read-across* e agrupamento de metabólitos. Ainda, no caso da avaliação de resíduos/ metabólitos, não são necessários testes adicionais quando não há previsão de genotoxicidade.

5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGROTÓXICOS PELA

Na identificação e caracterização de perigo relacionado à exposição a agrotóxicos, em geral, dispõe-se de uma base de dados bastante heterogênea e, portanto, de difícil comparação. Isso decorre de uma variabilidade quanto à validade e à precisão de estudos, quanto às linhas de evidências disponíveis (estudos observacionais em humanos, estudos em animais experimentais, dados *in vitro* e de modelos computacionais); e quanto ao delineamento dos estudos em si (espécies, modelos, desfechos avaliados, vias de exposição, regime de doses). Então, a fim de se alcançar uma interpretação conjunta das evidências obtidas em um mesmo estudo e entre diferentes estudos, faz-se necessária a utilização de um processo estruturado para a integração de evidências – a análise do peso de evidência (EFSA, 2017).

A abordagem de WoE, utilizada pela Anvisa para a avaliação do potencial de mutagenicidade de agrotóxicos, segue o mesmo racional adotado pelas agências americana e europeia. Nesse tipo de abordagem, mesmo estudos considerados de menor relevância podem ser incluídos na base de dados para avaliação, sendo atribuído a eles um menor peso diante da disponibilidade de estudos mais robustos. Ou seja, pode haver elementos de um determinado estudo que dão suporte a outras evidências acerca do potencial mutagênico do composto em questão. A RDC nº 294/2019 define peso da evidência como a “interpretação dos dados toxicológicos no contexto de todas as informações disponíveis em que são avaliadas a força e a qualidade das evidências relacionadas a uma decisão;” e a força da evidência é definida como o “grau de confiabilidade sobre o resultado de um determinado experimento com base em seu nível de significância estatística e/ou biológica e em seu delineamento experimental”.

Esse processo ocorre em três etapas, quais sejam: 1) agrupamento de evidências em linhas de evidência de tipo semelhante; 2) atribuição de peso às evidências; e 3) integração das evidências. Além disso, ele se embasa em três considerações fundamentais – confiabilidade, relevância e adequabilidade dos dados disponíveis – a fim de concluir se essas evidências combinadas são suficientes para responder a uma dada questão. Confiabilidade consiste no quão corretas são as informações que compõem uma linha de evidência e inclui os critérios de exatidão (grau de erro sistemático ou viés) e precisão (grau de erro aleatório). Relevância é a contribuição fornecida por determinada linha de evidência para responder a uma pergunta específica, considerando que as informações compreendidas nessas evidências são totalmente confiáveis. Isso abrange a relevância biológica, como também a relevância em relação a outras considerações, por exemplo temporal, espacial, química, dentre outros. Consistência se refere ao grau de compatibilidade entre as contribuições de diferentes linhas de evidência para responder à pergunta especificada (EFSA, 2017).

Em sua análise do WoE, a Anvisa considera os dados provenientes de todos os estudos disponíveis – tanto regulatórios quanto da literatura científica. Cada um deles

é avaliado quanto aos seguintes parâmetros: força (magnitude) e especificidade da associação observada; consistência (reprodutibilidade dos achados); concordância e relação exposição-efeito; temporalidade (exposição deve ser anterior ao efeito observado); plausibilidade biológica e coerência (verificação de exposição – efeito em diferentes tipos de evidências – *in vitro*, *in vivo* em animais e em humanos); seleção de eventos-chave ou parâmetros mensuráveis, quando o mecanismo de ação ou a via do efeito adverso (MoA/AOP) é conhecido.

Aos dados provenientes de estudos não-regulatórios pode-se atribuir grande peso de evidência quando as seguintes condições forem atendidas, tais como (ECHA, 2017):

- Adequabilidade para fins de classificação e/ou avaliação de risco;
- Análise adequada e confiável dos principais parâmetros previstos para serem investigados nas diretrizes correspondentes;
- Período de exposição à substância teste de duração compatível ou mais prolongada do que aquela prevista na metodologia da diretriz correspondente;
- Apresentação de relatório de estudo adequado e confiável.

Para a determinação do potencial mutagênico, a Anvisa, em alinhamento com as agências europeia e americana, prioriza a análise de ensaios que determinem alterações hereditárias no DNA capazes de ocasionar o desenvolvimento de doenças, isto é, desfechos relativos à mutagenicidade, e não apenas à genotoxicidade. Enquanto dados de genotoxicidade podem ajudar na compreensão da via mecanística associada ao efeito adverso de uma substância química, o peso deles é menor na avaliação do perigo do que os específicos para mutagenicidade. Apesar disso, os ensaios de genotoxicidade podem ser determinantes para se concluir sobre a mutagenicidade de uma substância, quando incluídos na análise do WoE (USEPA, 2012). Adicionalmente, são recomendadas informações de apoio provenientes de estudos *in silico* e/ou mecanísticos *in vitro*, em particular para maior esclarecimento de resultados equívocos, podendo, a depender do caso específico, evitar o avanço da investigação com ensaios *in vivo*. Esses testes incluem diretrizes validadas pela OECD ou por outras autoridades que tenham similaridade de requisitos regulatórios e validação, conforme previsto no Art. 6º da RDC nº 294/2019.

Nas metodologias de avaliação da mutagenicidade adotadas pela USEPA e pela EFSA, em concordância com o posicionamento de diferentes especialistas em genotoxicidade, resta claro que se um ou mais ensaios *in vitro* são positivos e nenhum efeito é detectado *in vivo*, o risco de genotoxicidade é baixo (Thybaudet et al., 2011). Ou seja, resultados negativos *in vitro* usualmente são indicativos fortes de ausência de mutagenicidade. Entretanto, há exceções a essa colocação e algumas moléculas – mesmo com resultados negativos *in vitro* – podem ser mutagênicas. Assim, se houver indícios de que os mecanismos ou rotas metabólicas da substância não podem ser

avaliados *in vitro*, pode ser necessário modificar o sistema metabólico *in vitro* utilizado, por exemplo, com a utilização de linhagens celulares de fígado humano ou modelos de células hepáticas 3D, os quais apresentam metabolismo semelhante ao encontrado em células hepáticas humanas *in vivo*; ou, como último recurso caso estas não sejam abordagens viáveis, é necessário realizar um ensaio *in vivo* (EFSA, 2012).

Embora muitos testes *in vitro* sejam rotineiramente utilizados e aceitos pelas autoridades reguladoras, eles apresentam limitações importantes que dificultam a predição do potencial mutagênico ou genotóxico de uma substância *in vivo* em mamíferos, especialmente em humanos. Essas limitações incluem: inexistência de ativação metabólica semelhante à humana, ausência da toxicocinética, supersensibilidade em relação aos testes *in vivo*, baixa especificidade e uso de culturas celulares nem sempre relevantes para predição da genotoxicidade em órgãos-alvos (Thybaud et al., 2011).

Em geral, as mutações podem ser diferenciadas em mutações gênicas (por exemplo, mutações pontuais), mutações cromossômicas estruturais (clastogenicidade) e mutações cromossômicas numéricas (aneuploidia e poliploidia). A aneuploidia corresponde à alteração no número de cromossomos numa célula haploide ou diploide, não múltiplo do haploide, levando a ganho ou perda de cromossomos na célula-filha. Já a poliploidia corresponde à multiplicação de todo o conjunto de cromossomos da célula (múltiplo do haploide). Os dois principais mecanismos de aneugenicidade, isto é, envolvidos no desfecho de aneuploidia, são a não-disjunção cromossômica na anáfase e o atraso do arrasto de cromossomos durante a mitose ou a meiose. Já a poliploidia resulta de erro mitótico, endorreduplicação ou fusão celular (EFSA, 2021).

Diferentes ensaios podem detectar esses diferentes desfechos mutagênicos, além de efeitos genotóxicos, os quais devem ser considerados na determinação do WoE. Por exemplo, uma substância teste que causa apenas mutações cromossômicas pode ser negativa em um teste para detecção de mutações pontuais. Assim, um conjunto de dados complexo, com resultados positivos e negativos, ainda pode levar à classificação dependendo da consistência dos resultados positivos (ECHA, 2017, 2024).

Conforme descrito acima, é atribuído maior peso aos estudos de mutação gênica e cromossômica do que aos estudos de dano primário ao DNA e aos outros estudos de genotoxicidade. Ainda, é atribuído maior peso aos estudos *in vivo* do que aos estudos *in vitro*, como também maior peso aos resultados obtidos pela via oral, por ser a mais representativa da exposição humana. Nenhum ensaio é suficiente para avaliar todos os tipos de alterações genéticas que podem ocorrer. Por essa razão, deve-se realizar uma bateria de ensaios para cobrir os principais desfechos genéticos e tomar uma decisão regulatória com base no WoE sobre o potencial mutagênico de uma substância (OECD, 2016).

É importante esclarecer que a obtenção de um resultado positivo para

mutagenicidade em célula somática ou germinativa após administração intraperitoneal (i.p.) indica que a substância teste tem uma propriedade mutagênica intrínseca; e a obtenção de resultados negativos por outras vias de administração pode estar relacionada a fatores que influenciam a distribuição/ metabolismo, os quais podem ser característicos da espécie animal testada. Então, não se pode excluir a relevância para humanos de resultados positivos obtidos em estudos pela via i.p. em roedores. Desse modo, embora a administração i.p. não seja, desde 2016, geralmente recomendada para novos testes (sem justificativa científica) por não ser uma via de exposição humana esperada, os estudos existentes com essa via devem ser incluídos na análise (ECHA, 2024).

Nos casos em que existam dados adicionais de outros testes *in vivo* com administração oral, cutânea ou inalatória, será empregado o WoE para se alcançar uma conclusão. Por exemplo, se há, pelo menos, um teste *in vivo* positivo com aplicação i.p., associado a, pelo menos, um resultado negativo *in vivo* efetuado pelas vias oral, cutânea ou inalatória, a decisão quanto à classificação pode não ser trivial. Nesse caso, pode-se supor que a mutagenicidade / genotoxicidade ocorre somente em um nível de dose interna alcançado após administração i.p., e não pelas demais vias testadas. No entanto, também deve-se considerar que, em geral, não se pode estabelecer um limiar para a mutagenicidade, a menos que haja evidências específicas da existência de tal limiar (por exemplo, no caso de aneugenicidade). Assim, se a mutagenicidade/ genotoxicidade for exclusivamente demonstrada para a via i.p., isso pode significar que é possível a ocorrência de efeitos mutagênicos/ genotóxicos também nos testes conduzidos pelas demais vias, mas estes podem não ter sido detectados por estarem abaixo do limite de detecção desses testes (ECHA, 2024).

Todo esse processo deve culminar na classificação dos agrotóxicos quanto à mutagenicidade, conforme os critérios das categorias de classificação toxicológica da RDC nº 294/2019, descritas no Quadro 1. Para essa classificação, considera-se como evidência do potencial de determinada substância teste em causar mutações em células germinativas: observações de alterações nas gônadas ou nas células germinativas, por meio de resultados de ensaios genotóxicos, citotóxicos ou de outros efeitos sobre a reprodução após exposição aguda, subcrônica ou crônica, bem como de ensaios de toxicocinética que mostram as gônadas como tecido alvo da substância avaliada.

Assim, para cada tipo de estudo e cada desfecho genotóxico, é feita uma análise do WoE separada. Na prática, não é incomum a obtenção de uma evidência positiva de mutagenicidade em apenas um tipo de teste ou para um dado desfecho, conforme exemplificado anteriormente. Nesses casos, os resultados positivos e negativos para diferentes desfechos não são conflitantes, mas ilustram a vantagem em se utilizar métodos de ensaio para uma variedade de alterações genéticas, de modo a aumentar a probabilidade de identificação de substâncias com potencial mutagênico. Portanto, os resultados de estudos que avaliam diferentes desfechos genotóxicos não são

combinados em uma análise geral do WoE, mas sim submetidos a tal análise separadamente.

Então, a análise individual de cada um desses estudos deve concluir pela sua positividade ou negatividade em relação ao potencial mutagênico da substância testada na condição experimental avaliada no ensaio. Quando não for possível concluir quanto à positividade ou negatividade dos resultados, considera-se que o resultado é equívoco (interpretado como igualmente provável que seja positivo ou negativo). Nos casos em que se verifica limitações metodológicas ou falhas substanciais na descrição da metodologia ou dos resultados que podem comprometer a avaliação, o estudo deve ser considerado inconclusivo e não deve ser utilizado na avaliação do WoE. Nesses casos, repetir o teste sob as condições corretas pode produzir um resultado claro. Evidências de suporte fornecidas por métodos *in silico* e estudos mecanísticos e toxicocinéticos *in vitro* podem auxiliar no esclarecimento de resultados equívocos por meio da abordagem de WoE, evitando assim a condução de ensaios *in vivo* adicionais.

De forma mais detalhada, atribui-se, nessa ordem, maior peso aos estudos *in vivo* em humanos, estudos *in vivo* em mamíferos com células germinativas, estudos *in vivo* em mamíferos com células somáticas, estudos *in vitro* em células de mamíferos e de mutação reversa em células bacterianas. Os estudos que mostram efeitos genotóxicos não mutagênicos podem ser utilizados tanto para corroborar os efeitos observados em estudos de mutagenicidade, como para aumentar a preocupação quanto ao potencial mutagênico da substância avaliada, e devem ser considerados como parte do WoE para classificação dos agrotóxicos.

Com relação ao enquadramento nas categorias de classificação detalhadas no Quadro 1, até o momento, os estudos epidemiológicos não foram capazes de fornecer evidências para classificar uma substância teste na Categoria 1A. As doenças hereditárias em humanos, em sua maioria, têm origem desconhecida e apresentam distribuição variável em diferentes populações. Devido à distribuição aleatória de mutações no genoma, não se espera que uma determinada substância induza um distúrbio genético específico. Portanto, é improvável a obtenção de evidências robustas, a partir de estudos epidemiológicos, suficientes para embasar a classificação de uma substância teste na Categoria 1A (ECHA, 2017).

Já o enquadramento na Categoria 1B pode ser efetuado com base em resultados positivos de, no mínimo, um teste *in vivo* de mutagenicidade em células germinativas de mamíferos. Na ausência desses dados, a classificação nessa categoria requer resultados positivos de um teste *in vivo* válido de mutagenicidade em células somáticas em mamíferos, associados a evidências experimentais adicionais, as quais podem incluir a demonstração da capacidade da substância teste, ou de seu (s) metabólito (s), de interagir com o material genético das células germinativas. Ou seja, caso seja comprovada mutagenicidade/ genotoxicidade *in vivo* e a substância teste esteja sistemicamente disponível, ela deve ser enquadrada na Categoria 1B, uma vez

que as células germinativas, como a espermatogônia, geralmente não são protegidas da exposição à substância teste pela barreira hemato-testicular (ECHA, 2017).

Por fim, a classificação na Categoria 2 pode ser baseada em resultados positivos de, no mínimo, um teste *in vivo* válido de mutagenicidade em células somáticas de mamíferos; ou em resultados positivos de, no mínimo, um teste *in vivo* válido de genotoxicidade de células somáticas de mamíferos, apoiado por resultados positivos de mutagenicidade *in vitro*. Resultados *in vitro* só podem levar a uma classificação na Categoria 2 quando reforçados por dados de relação estrutura-atividade com agentes mutagênicos de células germinativas conhecidos. Ainda, a classificação nessa categoria também se aplica nos casos em que há resultados positivos de testes *in vivo* pela via IP e há plausibilidade para os resultados negativos obtidos pelas demais vias de administração (oral, cutânea e inalatória). Alguns fatores que influenciam essa plausibilidade são as doses avaliadas nos estudos e os dados de toxicocinética da substância teste. Entretanto, como essa análise será efetuada caso a caso, pela abordagem de WoE, também é possível se concluir pela não classificação dessa substância teste (ECHA, 2017).

6. USO DE AVALIAÇÕES DE AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS COMO PARTE DA AVALIAÇÃO DO PESO DA EVIDÊNCIA

A partir das análises do item 4 (Avaliação do potencial mutagênico de agrotóxicos por autoridades regulatórias internacionais) e do item 5 (Avaliação do potencial mutagênico de agrotóxicos pela Anvisa), depreende-se que as abordagens regulatórias utilizadas entre os diferentes países são bastante similares e alinhadas, levando a análises sobre o potencial mutagênico bastante semelhantes. Por isso, as discussões internacionais já realizadas são incluídas na avaliação do WoE feita pela Anvisa.

Nesse contexto, para a avaliação do potencial mutagênico dos agrotóxicos, pode-se iniciar pela comparação das conclusões internacionais e sua adequabilidade ao contexto regulatório no Brasil, incluindo a análise da USEPA e EFSA, quando disponíveis, bem como de outras autoridades regulatórias. Havendo suficiente harmonia entre as discussões internacionais sobre o potencial mutagênico dos agrotóxicos, concordância com a avaliação do peso da evidência realizada no Brasil e adequabilidade das conclusões à legislação brasileira, é aceitável que as conclusões da Anvisa sejam alcançadas somente com base nas discussões internacionais, isto é, sem um aprofundamento na análise dos estudos. Contudo, no caso da existência de discordâncias relevantes entre as autoridades internacionais, superficialidade ou discrepâncias no modo de avaliação da qualidade dos estudos, diferenças significativas na quantidade de estudos incluídos nas análises e existência de novas evidências, deve-se realizar análise mais aprofundada, incluindo detalhamento dos estudos relevantes para conclusão sobre o peso da evidência.

7. ESTRATÉGIA INTEGRADA DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE

O princípio dessa estratégia integrada consiste na utilização de diferentes conjuntos de informações – incluindo tanto dados não-experimentais (abordagens *in silico*) quanto dados de ensaios *in vitro* e *in vivo* – para uma avaliação abrangente do potencial mutagênico de uma substância, uma vez que não existe um único ensaio capaz de detectar todos os mecanismos genotóxicos (ECHA, 2017).

Conforme já mencionado nos itens 3 e 5 deste guia, a RDC nº 294/2019 prevê os ensaios *in vitro*/ *in vivo* requeridos para estratégia de avaliação toxicológica de produtos técnicos e formulados. Além desses dados, para produtos técnicos equivalentes e para os IA em reavaliação, também são incluídos na análise do WoE os dados não-experimentais aqui discutidos.

Então, uma avaliação global do potencial mutagênico de uma substância requer informações sobre os diferentes desfechos de mutagenicidade (mutações gênicas, danos cromossômicas estruturais e numéricos). Tais informações podem ser obtidas a partir de dados/ ensaios disponíveis com a substância em si ou, por vezes, por meio de previsões utilizando métodos *in silico* adequados (por exemplo, abordagem por categorias, comparação por interpolação (*read-across*) ou modelos (quantitativos) da relação estrutura/atividade ((Q)SAR) (ECHA, 2017).

É importante que as informações disponíveis sobre as propriedades físico-químicas da substância teste sejam consideradas para que se elabore uma estratégia de testes adequada. Essas informações podem impactar tanto na seleção dos sistemas de teste a serem empregados quanto nas modificações dos protocolos de teste utilizados. A estrutura química de uma substância pode fornecer informações para uma avaliação inicial do potencial mutagênico. Os testes *in vitro* são particularmente úteis para compreender a potencial mutagenicidade de uma substância e desempenham um papel importante nesta estratégia de testes. Podem ser necessários testes em animais para esclarecer a relevância dos resultados positivos *in vitro* e para avaliar vias metabólicas específicas que não podem ser adequadamente simuladas *in vitro* (ECHA, 2017).

As propriedades toxicocinéticas e toxicodinâmicas da substância teste devem ser consideradas antes da realização ou avaliação de ensaios em animais. A compreensão destas propriedades possibilita o desenvolvimento de protocolos apropriados para os ensaios padrão, especialmente quanto ao(s) tecido(s) a ser(em) investigado(s), à via de administração da substância e à dose máxima testada (ECHA, 2017).

7.1. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE

7.1.1. Dados não-experimentais (métodos *in silico*)

Essa categoria de dados sobre a mutagenicidade de uma substância teste pode ser obtida de diversas formas – a partir da simples análise da estrutura química por meio de métodos de comparação por interpolação (*read-across*), simuladores metabólicos e

análises (Q)SAR. A utilidade de tais técnicas varia com a quantidade e natureza da informação disponível, bem como com as questões regulatórias específicas a serem consideradas (ECHA, 2017).

Métodos de *read-across* e agrupamento de substâncias podem ser utilizados para prever as propriedades mutagênicas da substância teste a partir dos dados já disponíveis para substâncias análogas. O embasamento científico para estabelecer racionais de agrupamento e casos de *read-across* é apresentado no Guia da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development* - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) sobre agrupamento de compostos químicos (OECD, 2014 *apud* ECHA, 2017).

Os modelos de predição (Q)SAR também são ferramentas úteis na avaliação de potenciais efeitos mutagênicos/genotóxicos de substâncias teste. Existem centenas de modelos (Q)SAR disponíveis na literatura, contudo, a qualidade dos relatórios varia de um modelo para outro e a confiabilidade das predições deve ser avaliada caso a caso. A ferramenta (Q)SAR da OECD (<https://qsartoolbox.org/>) é um programa gratuito, desenvolvido pela ECHA e pela OECD, que possibilita uma avaliação de perigo reprodutível e transparente. Tal ferramenta facilita a aplicação prática de abordagens de agrupamento e *read-across* para preencher lacunas de dados, sendo frequentemente utilizada na avaliação da relevância toxicológica de metabólitos e impurezas de agrotóxicos, bem como para apoiar conclusões sobre IA (ECHA, 2017).

As predições efetuadas por essa ferramenta abrangem os ensaios de mutação gênica *in vitro* (teste de Ames), de aberração cromossômica *in vitro/in vivo* e do teste de micronúcleo. Elas se baseiam na implementação de uma série de perfis relacionados à genotoxicidade e à carcinogenicidade (para avaliar rapidamente as substâncias quanto a mecanismos ou modos de ação comuns); como também na incorporação de numerosas bases de dados com resultados fornecidos por estudos experimentais (ECHA, 2017).

É importante considerar alguns princípios a serem seguidos na avaliação de predições (Q)SAR e de resultados baseados em múltiplas predições: 1) a entrada de dados correta; 2) o ajuste da substância dentro do domínio de aplicabilidade do modelo; 3) a confiabilidade da predição; e 4) a adequação do resultado ao propósito identificado. Assim, qualquer predição obtida por meio de modelos (Q)SAR deve ser avaliada criticamente antes da sua utilização, sendo importante considerar os pontos fortes e as limitações dos diferentes modelos ao utilizá-los para fins preditivos (OECD, 2023).

7.1.2. Dados experimentais

Nos itens a seguir, serão descritos os ensaios considerados relevantes pela OECD para a caracterização da mutagenicidade de agrotóxicos, também previstos nos Anexos I e II da RDC nº 294/2019 como requisitos para a avaliação toxicológica de produtos técnicos e produtos formulados, respectivamente. Para a análise desses produtos, os

estudos apresentados devem ser conduzidos de acordo com as diretrizes de testes vigentes publicados pela OECD ou por outras autoridades que tenham similaridade de requisitos e validação, conforme previsto no Art. 8º da RDC nº 294/2019.

Já no processo de reavaliação de IA de agrotóxicos, nenhum tipo de dado é considerado pré-requisito para a tomada de decisão regulatória, sendo possível alcançá-la com a informação existente no momento da reavaliação. Esse conjunto de informações provém: 1) das empresas detentoras de registros de produtos técnicos e formulados à base do IA em reavaliação, as quais são notificadas a protocolar na Anvisa todos os estudos regulatórios de mutagenicidade/ genotoxicidade disponíveis; 2) da literatura científica, mediante revisão sistemática; e 3) dos relatórios das principais agências regularoras internacionais. Ou seja, todos estudos existentes – regulatórios e da literatura científica – quando do início da reavaliação, são avaliados individualmente quanto à qualidade e à força, a fim de se verificar a pertinência de inclusão na base de dados, seguindo a abordagem de WoE já discutida no item 5. Assim, os estudos que possuem protocolos mais alinhados às Diretrizes da OECD recebem um maior peso na análise da evidência em comparação aqueles que apresentam muitas divergências e/ou limitações metodológicas.

Ainda, reitera-se que outros ensaios que não tenham sido aqui descritos, quando considerados relevantes, poderão ser incluídos na análise do WoE, seguindo os mesmos critérios aqui estabelecidos. No Quadro 3, consta um resumo dos ensaios aprovados pela OECD indicados neste guia.

Quadro 3: Ensaios regulatórios *in vitro* e *in vivo* indicados para a avaliação da mutagenicidade.

	ENSAIOS	DESFECHOS AVALIADOS	DIRETRIZ
IN VITRO	Teste de mutação reversa em bactérias (Teste de Ames)	Mutação gênica	OECD 471
	Teste de mutação gênica em células de mamíferos usando os genes <i>Hprt</i> ou <i>xprt</i>	Mutação gênica	OECD 476
	Teste de mutação gênica em células de mamíferos usando o gene Timidina quinase	Mutação gênica e aberrações cromossômicas estruturais	OECD 490
	Teste de aberração cromossômica em células de mamíferos ¹	Aberração cromossômica estrutural	OECD 473
	Teste de micronúcleo em células de mamíferos	Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas	OECD 487
IN VIVO	Teste de micronúcleo em eritrócito de mamíferos	Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas	OECD 474
	Teste de aberração cromossômica na medula óssea de mamíferos ¹	Aberração cromossômica estrutural	OECD 475
	Ensaio de mutação gênica em células germinativas e somáticas de roedores transgênicos	Mutação gênica e rearranjos cromossômicos (este último especificamente nos modelos de ensaio com plasmídeo e	OECD 488

Spi-)		
Ensaio de mutação no gene <i>Pig-a</i> em eritrócitos de mamíferos	Mutação gênica	OECD 470
Teste de aberração cromossômica em espermatozônios de mamíferos ¹	Aberrações cromossômicas estruturais	OECD 483
Teste de dominante letal em roedores ²	Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas	OECD 478
Ensaio de translocação herdável em camundongos ²	Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas	OECD 485

¹ Um aumento na poliploidia pode indicar que a substância teste tem potencial para induzir aberrações cromossômicas numéricas, mas esse teste não é ideal para medir aberrações numéricas e não é recomendado para esse fim.

² A condução desse ensaio para gerar novos dados é desaconselhada pela Anvisa em decorrência da grande quantidade de animais utilizada e da existência de outros ensaios capazes de avaliar esses desfechos mutagênicos.

Os tópicos abaixo fornecem informações de cada ensaio individualmente, bem como recomendações para a sua avaliação. Maior detalhamento para a condução dos estudos deve ser verificado nas respectivas Diretrizes da OECD.

Ressalta-se que na condução de novos estudos devem ser consultadas as versões mais atualizadas disponíveis das diretrizes OECD. No entanto, é importante esclarecer que os estudos conduzidos anteriormente às atualizações mais recentes dessas diretrizes e que, portanto, seguem protocolos anteriores aos aqui descritos continuam válidos, ainda que não cumpram os requisitos experimentais das diretrizes vigentes. Isso significa que, nesses casos, os estudos serão aceitos e avaliados caso a caso, com relação aos desvios dos protocolos atuais e potencial impacto na interpretação dos dados.

Os estudos serão subdivididos em *in vitro* e *in vivo*, e posteriormente, divididos pelo desfecho mutagênico detectado em cada teste especificamente. Para todos os estudos descritos, nos casos em que a resposta não for claramente negativa ou positiva, como auxílio no estabelecimento da relevância biológica, os resultados devem ser avaliados de acordo com o julgamento de especialistas. Repetição de experimentos com variações no desenho experimental podem ser úteis, mas, se mesmo essas investigações adicionais não forem suficientes para se concluir quanto à positividade ou negatividade dos resultados, deve-se concluir que o resultado é equívoco (interpretado como igualmente provável de que seja positivo ou negativo) (IPCS, 2020; ECHA, 2023).

Ainda, para os casos em que se verifica limitações metodológicas ou falhas substanciais na descrição da metodologia ou dos resultados que podem comprometer a avaliação, o estudo deve ser considerado inconclusivo e não deve ser utilizado na avaliação do WoE (IPCS, 2020; ECHA, 2023).

O Quadro 4 apresenta, de forma não exaustiva, uma visão geral de aspectos relevantes a serem considerados para a avaliação de resultados positivos e negativos em

Quadro 4. Aspectos relevantes (rol não exaustivo) para a avaliação de resultados positivos e negativos de estudos de mutagenicidade (IPCS, 2020; ECHA, 2023).

Estudos com resultados positivos	Estudos com resultados negativos
• Relação dose-resposta; • Presença de impurezas genotóxicas conhecidas; • Para estudos <i>in vitro</i>: condições de teste (por exemplo, pH, osmolaridade, precipitados) e fatores que influenciam especificidade dos ensaios (por exemplo, linhagem celular, concentração máxima testada, citotoxicidade e sistema de ativação metabólica).	• Condições de teste (por exemplo, solubilidade da substância teste, precipitados no meio), grau de variabilidade entre replicatas, alta incidência no controle concorrente; controle histórico amplamente disperso; • Seleção de doses/ concentrações quanto ao espaçamento e maior valor testado (sinais de (cito)toxicidade ou alcance da concentração limite do ensaio). As respostas geradas apenas em doses ou concentrações altamente (cito)tóxicas devem ser interpretadas com cautela; • Sensibilidade do sistema de teste empregado (por exemplo, alguns ensaios <i>in vitro</i> são sensíveis a mutações pontuais e pequenas deleções, mas não a grandes deleções); • Estabilidade ou volatilidade da substância teste; • Para estudos <i>in vitro</i>: adequabilidade do sistema de ativação metabólica, do tamanho amostral para detectar significância estatística, dos tecidos amostrados e da exposição de tecidos-alvo à substância teste; • Para estudos <i>in vivo</i>: adequabilidade da amostragem (número de animais, intervalos de coletas e número de células marcadas/ amostradas).

7.1.2.1. Ensaio *in vitro*

Esse tipo de ensaio é conduzido em períodos de exposição relativamente curtos (3-24h). Períodos mais longos não são considerados úteis, uma vez que os desfechos a serem avaliados, em geral, diminuem no decorrer do tempo. Além disso, esses ensaios utilizam concentrações elevadas da substância teste, a fim de induzir níveis detectáveis de danos genéticos nesses curtos períodos de exposição. Por fim, esses ensaios normalmente requerem a inclusão de alguma fonte exógena de ativação metabólica.

O sistema mais comumente utilizado é a fração microsomal S9 homogeneizada

de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir do fígado de roedores expostos a agentes indutores enzimáticos). O tipo e a concentração desses sistemas devem ser selecionados com base na classe da substância a ser testada. Entretanto, cabe destacar que esses sistemas de ativação metabólica não mimetizam por completo as condições encontradas nos ensaios *in vivo* com mamíferos. Portanto, essa categoria de ensaios não fornece informações diretas acerca do potencial mutagênico e carcinogênico de substâncias em animais.

I. Ensaios *in vitro* de mutação gênica

a) Teste de mutação reversa em bactérias (Teste de Ames) – Diretriz OECD 471

Considerações iniciais e limitações

Esse ensaio é normalmente empregado como varredura inicial de atividade mutagênica por ser rápido, barato e de fácil execução. Ele é capaz de detectar mutações pontuais, tais como substituições, adições ou deleções de um ou poucos pares de bases. A especificidade das linhagens empregadas no teste pode fornecer algumas informações úteis sobre os tipos de mutações induzidas por agentes mutagênicos, como o seu mecanismo de ação.

É importante destacar que um resultado positivo numa linhagem e numa condição metabólica de teste já é considerado relevante e resultados positivos em linhagens adicionais não necessariamente aumentam o nível de confiança na resposta mutagênica encontrada (OECD, 2016).

Algumas limitações desse ensaio estão listadas abaixo:

- Utilização de células procariotas, as quais diferem dos mamíferos quanto à captação celular, ao metabolismo, à estrutura cromossômica e aos processos de reparo do DNA;
- Impossibilidade de emprego na análise de compostos altamente bactericidas (por exemplo, certos antibióticos) e naqueles que interferem especificamente no sistema de replicação de células de mamíferos (por exemplo, alguns inibidores da topoisomerase e alguns análogos de nucleosídeos);
- Risco de fornecer resultados falso-negativos, em casos de compostos que atuam por meio de outros mecanismos, não-genotóxicos ou ausentes em células bacterianas.

Apesar disso, o estudo é considerado confiável na predição da mutagenicidade em humanos por todos os organismos internacionais.

Princípio do teste

Esse ensaio consiste na exposição à substância teste de linhagens mutantes de duas espécies de bactérias - *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, as quais não sintetizam aminoácidos específicos e, conseqüentemente, não crescem na ausência deles no meio de cultura. Dessa forma, a exposição ao agente mutagênico irá induzir

uma reversão da mutação inicial, acarretando a restauração da sequência de DNA original, o que é verificado por meio do reestabelecimento da capacidade funcional dessas bactérias, chamadas revertentes, de sintetizarem o aminoácido essencial.

Detalhamento do método

O teste de Ames pode ser realizado por dois métodos principais: ensaio de incorporação em placa e ensaio de pré-incubação, os quais podem ser conduzidos na presença ou ausência de ativação metabólica. Para ambos os métodos, após 2-3 dias de incubação, o número de colônias revertentes é contado e comparado ao controle. Vale ressaltar que algumas classes de agentes mutagênicos, como azo corantes, gases, compostos diazo e voláteis, nem sempre são detectadas com o uso desses métodos padrão e, nesses casos, faz-se necessário o emprego de procedimentos alternativos.

Para a realização do ensaio, as culturas devem crescer até a fase exponencial tardia ou até a fase estacionária inicial (10^9 células/mL). Culturas na fase estacionária tardia não devem ser utilizadas. Com relação à seleção das linhagens, pelo menos 5 devem ser usadas, na combinação descrita abaixo:

- *S. typhimurium* TA1535; e
- *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a; e
- *S. typhimurium* TA98; e
- *S. typhimurium* TA100; e
- *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

Dessas linhagens indicadas, TA100 e TA1535 detectam agentes mutagênicos que induzem substituições de pares de bases; TA1537 ou TA97 ou TA97a e TA98 detectam agentes mutagênicos que levam a deslocamentos de quadros de leitura, inserções ou deleções; e *Escherichia coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102 detectam mutágenos indutores de danos oxidativos.

Para determinar a concentração da substância teste, deve-se considerar os critérios de citotoxicidade e solubilidade da mistura final. A citotoxicidade pode ser detectada pela redução no número de colônias revertentes ou no grau de sobrevivência das culturas tratadas. A citotoxicidade de uma substância pode ser alterada na presença de sistemas de ativação metabólica. A insolubilidade deve ser avaliada como precipitação na mistura final nas condições reais de teste e evidente a olho nu.

É importante que, para substâncias citotóxicas, o ensaio detecte citotoxicidade, com a dose máxima atingindo cerca de 50% de citotoxicidade. Já a solubilidade pode ser avaliada pela precipitação na mistura final, a qual deve ocorrer nas condições de teste e ser evidente a olho nu.

Deve-se utilizar, no mínimo, 5 concentrações da substância teste, com intervalos de aproximadamente $\sqrt[3]{10}$ (~3,16), em triplicatas. A escolha das concentrações deve ser conduzida da seguinte forma, com base na solubilidade e toxicidade do composto:

- Solúvel e não-citotóxico – concentração máxima de 5,0 mg/placa ou 5µl/placa;
- Solúvel e citotóxico já abaixo de 5 mg/placa ou 5 µl/placa – concentração máxima na qual ocorra citotoxicidade;
- Insolúvel em 5,0 mg/placa ou 5µl/placa e não-citotóxico – concentração máxima na qual ocorra precipitação;
- Insolúvel em 5,0 mg/placa ou 5µl/placa e citotóxica já abaixo de 5 mg/placa ou 5 µl/placa – concentração máxima acima da citotóxica e na qual ocorra precipitação.

Testes acima da concentração de 5 mg/placa ou 5 µl/placa podem ser considerados ao avaliar substâncias que contenham quantidades substanciais de impurezas potencialmente mutagênicas.

Critérios de aceitabilidade

Adicionalmente, deve-se incluir em cada ensaio controles negativos (solvente ou veículo) e positivos (a fim de confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa), com e sem ativação metabólica.

A citotoxicidade excessiva é uma limitação importante, pois dificulta a interpretação do resultado e, portanto, pode tornar o estudo inconclusivo.

Análise e interpretação dos resultados

Para uma análise adequada desse estudo, deve-se apresentar o número de colônias revertentes por placa, a média relativa de revertentes (n° revertentes tratado/ n° revertentes controle) e os dados dos controles positivo e negativo.

Uma substância teste pode ser considerada positiva nos casos de:

- Aumento reprodutível, em uma ou mais concentrações, no número de colônias revertentes por placa, em pelo menos uma linhagem, com ou sem ativação metabólica; ou
- Aumento concentração-dependente no número de colônias revertentes por placa, em pelo menos uma linhagem, com ou sem ativação metabólica.

O aumento reprodutível mencionado acima pode ser verificado a partir de diferenças estatisticamente significativas entre o grupo exposto e o controle; ou pela regra de dobramento, isto é, índice ou razão de mutagenicidade (RM) igual ou superior a 2,0 para as linhagens TA98, TA100, TA102, TA97, TA97a e WP2; e igual ou superior a 3,0 para as linhagens TA1535 e TA1537.

Uma substância teste cujos resultados não cumpram os critérios acima é considerada não mutagênica neste teste. Resultados equívocos devem ser esclarecidos por meio de testes adicionais, de preferência com modificações nas condições experimentais (espaçamento entre concentrações; método de tratamento por incorporação em placa ou pré-incubação líquida; e condições de ativação metabólica).

Caso o conjunto de dados permaneça ambíguo ou questionável, isto é, sem resultados claramente positivos ou negativos, mesmo após a condução de testes adicionais, o estudo será considerado inconclusivo e não será incluído na análise do WoE.

É importante destacar que a relevância biológica dos resultados deve ser primeiramente considerada e métodos estatísticos podem ser utilizados como auxílio na avaliação dos resultados. Ou seja, a significância estatística não deve ser o único fator determinante para uma resposta positiva.

b) Teste de mutação gênica em células de mamíferos usando os genes *Hprt* ou *xprt* – Diretriz OECD 476

Considerações iniciais e limitações

Esses testes, considerados de mutação direta (*forward mutation*), são capazes de identificar substâncias químicas que induzem mutações gênicas nos genes repórteres HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosil transferase) ou XPRT (xantina-guanina fosforibosil transferase), os quais detectam diferentes tipos de eventos genéticos. O ensaio HPRT permite a detecção de mutações pontuais, inserções e deleções de comprimentos variados, em decorrência de sua localização não autossômica (cromossomo X).

Por outro lado, a localização autossômica do transgene gpt (teste XPRT) pode permitir a detecção de mutações resultantes de grandes deleções e possivelmente de recombinação mitótica, não detectadas pelo teste HPRT. Isso porque esses eventos podem ser letais devido à falta de genes homólogos, uma vez que o gene HPRT está localizado no cromossomo X e apenas uma cópia é ativa por célula.

Princípio do teste

Esse ensaio consiste na exposição de culturas de células à substância teste durante um período de 3-6 horas. Após esse período, essas culturas são mantidas em meio de crescimento por tempo suficiente para alcançar uma expressão fenotípica ideal de mutações induzidas, ou seja, para que células mutantes recém-induzidas percam a sua enzima funcional Hprt ou gpt, o que ocorre em torno de 7 a 9 dias.

Em seguida, as células são novamente plaqueadas, na presença e ausência do agente citostático 6-tioguanina (TG), para a determinação do número de células mutantes e da eficiência de clonagem (EC), respectivamente. Essa incubação deve ocorrer por um intervalo de tempo suficiente para garantir o crescimento ideal das colônias (7 a 12 dias) para posterior cálculo da frequência de mutação (FM).

As células proficientes em Hprt (usadas no teste HPRT) ou em gpt (usadas no teste XPRT) são sensíveis a TG, o que causa a inibição de metabolismo celular e interrompe a divisão celular. Por outro lado, as células mutantes – deficientes na atividade da enzima Hprt ou gpt – são resistentes aos efeitos citostáticos desse agente e, portanto, são capazes de proliferar na presença de TG. Assim, a FM é calculada com base no número de colônias mutantes (contagem nas placas com TG) corrigido

pela EC (contagem nas placas sem TG). Ou seja, a FM deve ser expressa como o número de células mutantes por milhão de células viáveis.

Detalhamento do método

As linhagens de células mais comumente usadas para o ensaio HPRT são: CHO (*chinese hamster ovary* - ovário de hamster chinês), CHL (*chinese hamster lung* - pulmão de hamster chinês) e V79 de células de hamster chinês; linfoma de célula L5178Y de camundongo e células linfoblastóides humanas TK6.

Com relação ao ensaio XPRT, deve-se utilizar o transgene bacteriano gpt que codifica a enzima xprt, um análogo bacteriano da enzima HPRT de mamífero. Na Diretriz OECD 476, a única linhagem de células recomendada para esse ensaio é a AS52 (derivadas de CHO), contendo o transgene bacteriano gpt, no qual o gene HPRT foi excluído. O uso de outras linhagens celulares deve ser justificado e validado.

Sistemas de metabolização exógenos devem ser utilizados quando se empregam células que apresentam capacidade metabólica endógena inadequada. Com relação à seleção das concentrações da substância teste, deve-se basear, dentre outros fatores, na citotoxicidade e devem ser utilizadas, no mínimo, quatro concentrações de teste (não incluindo o solvente e os controles positivos). A citotoxicidade é determinada pela sobrevivência relativa (SRel), isto é, a EC medida imediatamente após o tratamento e ajustada para qualquer perda de células durante o tratamento, em comparação com o controle negativo.

Caso a substância teste apresente pouca ou nenhuma citotoxicidade, podem ser selecionados intervalos de concentração de aproximadamente 2 a 3 vezes. Em caso de citotoxicidade comprovada, as concentrações de teste selecionadas devem abranger uma faixa desde a que induz citotoxicidade até aquelas nas quais há citotoxicidade moderada a baixa ou nenhuma citotoxicidade.

Muitas substâncias teste exibem curvas dose-resposta íngremes e, a fim de cobrir toda a faixa de citotoxicidade ou estudar detalhadamente a relação dose-resposta, pode ser necessário usar um espaçamento menor entre as concentrações ou adicionar mais de quatro concentrações. Se a concentração máxima for baseada na citotoxicidade, ela deverá produzir entre 10-20% de sobrevivência. Deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados positivos encontrados apenas em doses com valores de sobrevivência iguais ou inferiores a 10%.

Para substâncias teste pouco solúveis e que não são citotóxicas abaixo da menor concentração insolúvel, a concentração mais alta analisada deve produzir turbidez ou um precipitado. Nos casos em que não há precipitação ou citotoxicidade limitante, a maior concentração de teste deve corresponder a 10 mM, 2 mg/mL ou 2 µL/mL, o que for mais baixo. Se a substância teste não tem uma composição definida, é possível adotar um limite de concentração máxima de 5 mg/mL, na ausência de citotoxicidade suficiente.

O número mínimo de células usadas para cada cultura testada (controle e tratada) em cada estágio do ensaio deve ser baseado na frequência de mutantes espontâneos, a qual é geralmente entre 5 e 20 x10⁻⁶. Para alcançar um valor mínimo de 5 x10⁻⁶ e manter um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais), mesmo para as culturas tratadas com concentrações que causam 90% de citotoxicidade durante o tratamento (10% sobrevivência), seria necessário tratar pelo menos 20 x 10⁶ células. Além disso, um número suficiente de células (mas nunca inferior a 2 milhões) deve ser cultivado durante o período de expressão e plaqueadas para seleção de mutantes.

O uso de duplicatas é aconselhável e os resultados obtidos nas culturas replicadas devem ser relatados separadamente, mas podem ser agrupados para a análise dos dados. O uso de mais de 4 concentrações pode ser particularmente importante quando o ensaio não é realizado em duplicatas.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se incluir em cada ensaio controles concorrentes negativos e positivos.
- Os números de colônias mutantes por 10⁶ células de controle devem ser encontrados no solvente e controles negativos dentro do controle histórico.
- Controles negativos concorrentes devem estar dentro do limite de 95% de distribuição do controle histórico negativo do laboratório, podendo ser aceitos valores superiores se houver clareza de que não correspondem a pontos fora da curva (*outliers*).
- Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo concorrente.
- Devem ser testadas duas condições experimentais – com e sem ativação metabólica.
- Deve-se utilizar um tempo de exposição de 3 a 6 horas.
- Deve-se proceder com a seleção adequada do número de células e das concentrações a serem testadas, com base nos critérios de concentração máxima supracitados.
- Deve-se utilizar pelo menos quatro concentrações (não incluindo os controles negativo e positivo) que cumprem os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade, número de células, dentre outros).
- A EC (viabilidade das células no momento da seleção) do solvente e controles negativos deve exceder 50%.

Resultados falso-positivos podem ser observados pela alteração de pH e osmolaridade, precipitação, interação dos componentes do meio de cultura ou excessiva toxicidade.

A citotoxicidade é uma limitação importante, pois dificulta a interpretação do resultado e, portanto, pode tornar o estudo inconclusivo.

Análise e interpretação dos resultados

Na apresentação dos resultados, deve-se incluir todos os dados necessários para calcular a citotoxicidade (expressa como SRel). Os dados, tanto para as culturas tratadas quanto controle, devem incluir o número de células contabilizadas ao final da exposição à substância teste, o número de células plaqueadas imediatamente após a exposição e a contagem de colônias. Adicionalmente, também devem ser incluídos todos os dados necessários para calcular a FM, tanto para as culturas tratadas quanto controle, quais sejam: (1) o número de células plaqueadas na presença e ausência de TG, durante a etapa de seleção de mutantes; e (2) contagem de colônias nas placas com e sem TG.

Com relação à interpretação dos resultados, um teste pode ser considerado claramente positivo se, em qualquer uma das condições experimentais analisadas, todos os critérios abaixo forem alcançados:

- Pelo menos uma das concentrações de teste apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente;
- O aumento for concentração-dependente, quando avaliado com um teste de tendência apropriado;
- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhuma das concentrações de teste apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não houver aumento concentração-dependente, quando avaliado com um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estiverem dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz mutações gênicas. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado, pode ser

necessário repetir o experimento com condições experimentais modificadas (por exemplo, espaçamento entre as concentrações testadas; outras condições de ativação metabólica). Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e o estudo não será incluído na análise do WoE.

c) Teste de mutação gênica em células de mamíferos usando o gene Timidina quinase – Diretriz OECD 490

Considerações iniciais e limitações

Neste item serão descritos dois ensaios distintos, ambos de mutação direta (*forward mutation*), capazes de identificar substâncias químicas que causam mutações no gene repórter da timidina quinase (TK). Cada ensaio utiliza linhagens celulares heterozigotas TK específicas: 1) o ensaio de linfoma de camundongo (*mouse lymphoma assay* - MLA) utiliza células L5178Y TK^{+/−} linhagem clonal 3.7.2c.; 2) o ensaio TK6 utiliza células humanas linfoblastóides TK6 (TK^{+/−}). Essas células contêm a enzima timidina-quinase (TK) e são sensíveis aos efeitos citotóxicos do composto trifluorotimidina (TFT), usado como agente seletivo nesses ensaios.

Vale ressaltar que, apesar da semelhança dos desfechos, essas linhagens celulares não são intercambiáveis. Os eventos genéticos detectados usando o locus TK incluem tanto mutações gênicas quanto eventos cromossômicos (grandes deleções, rearranjos cromossômicos e recombinação mitótica). Uma limitação importante a ser considerada consiste na análise de substâncias teste que são análogas da timidina ou se comportam como análogas da timidina, pois podem aumentar a FM e requerem métodos de teste adicionais para avaliação adequada.

Princípio do ensaio

A metodologia fundamenta-se na perda da heterozigotidade do locus dessa enzima (TK^{+/−} → TK^{−/−}) quando o gene é afetado por um agente mutagênico, ocasionando resistência das células mutantes à suplementação do meio com TFT. A perda de heterozigose é uma alteração genética comum em genes supressores de tumores.

Detalhamento do método

O método se divide em três etapas:

- I) Etapa de tratamento: As células em suspensão são expostas à substância teste, com e sem fonte exógena de ativação metabólica, por um período geralmente de 3-4 horas. O número cada cultura testada (controle e tratada) em cada estágio do ensaio deve-se basear na FM espontânea. De modo geral, deve-se tratar células suficientes para a manutenção de pelo menos 10, mas idealmente 100 mutantes espontâneos

durante todas as fases do ensaio (tratamento, expressão fenotípica e seleção de mutantes). Assim, é necessário tratar no ensaio MLA pelo menos 6×10^6 células; e no ensaio TK6, pelo menos 20×10^6 células.

- II) Etapa de expressão fenotípica: as células são novamente cultivadas para determinar a citotoxicidade e permitir a expressão fenotípica antes da seleção de mutantes. O período de incubação durante essa etapa de expressão fenotípica é de 2 dias, para o ensaio MLA; e de 3-4 dias para o TK6. A citotoxicidade deve ser determinada de forma individual para cada cultura teste e controle. No ensaio MLA, ela é avaliada usando o crescimento total relativo ($CTR = CRS \times ERC$), cujo cálculo inclui: CRS – crescimento relativo na suspensão (tratamento x controle) durante o período de 2 dias de expressão; e ERC – eficiência relativa de clonagem (tratamento x controle) obtida na fase de seleção de mutantes. Para o ensaio TK6, a citotoxicidade deve ser avaliada por meio da medida de SRel ou EC, já citada anteriormente no item referente à Diretriz OECD 476. Todos os critérios a serem adotados para a escolha das concentrações de tratamento seguem o mesmo racional também descrito no item referente à Diretriz OECD 476 e, portanto, não serão repetidos nesse item.
- III) Etapa de seleção de mutantes: um número conhecido de células é cultivado na presença e ausência do agente seletivo, para a determinação do número de células mutantes e da EC, respectivamente. Após um tempo de incubação adequado, as colônias são contadas. A FM é calculada com base no número de colônias mutantes corrigido pela EC e deve ser expressa como o número de células mutantes por milhão de células viáveis. As células mutantes do gene TK podem ter crescimento normal ou lento, sendo classificadas como grandes ou pequenas colônias no ensaio MLA; e como colônia de aparecimento precoce ou tardio no ensaio TK6. As colônias de crescimento normal são consideradas indicativas (mas não exclusivamente preditivas) de mutações pontuais ou outras de pequena escala induzidas por agentes mutagênicos, enquanto colônias de crescimento lento são consideradas indicativas de substâncias químicas que induzem danos cromossômicos e, por essa razão, apresentam tempo de duplicação mais prolongado.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios, aplicáveis a ambos os ensaios, devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se utilizar pelo menos quatro concentrações (não incluindo os controles negativo e positivo) que cumprem os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade, número de células, dentre outros);

- Deve-se incluir em cada ensaio controles concorrentes negativos (solvente) e positivos;
- Devem ser testadas duas condições experimentais – com e sem ativação metabólica, a menos que uma delas resulte em resultados positivos;
- Deve-se proceder com a seleção adequada do número de células e das concentrações a serem testadas, com base nos critérios de concentração máxima supracitados.
- Se a concentração máxima for baseada em citotoxicidade, ela deve atingir entre 10-20% de CTR/SRel.

Adicionalmente, para o ensaio de MLA, os critérios de aceitabilidade específicos para os controles negativos e positivos são:

- Controle negativo: FM espontânea entre $35-140 \times 10^6$ (ágar) e $50-170 \times 10^6$ (placa); EC entre 65-120%; crescimento em suspensão entre 8-32 vezes para tratamento de 3-4 horas e de 32-180 vezes para tratamentos de 24h, se conduzidos.
- Controle positivo: no mínimo um dos dois critérios a seguir deve ser atendido: I) indução de um aumento absoluto na FM total, ou seja, um aumento acima da mutação espontânea (uma FM induzida) de pelo menos 300×10^6 . No mínimo, 40% da FM induzida deve ser relativa às mutações ocorridas em pequenas colônias. II) indução de um aumento na FM em pequenas colônias de pelo menos 150×10^6 acima do observado no controle negativo concorrente.

Para o ensaio TK6, os critérios de aceitabilidade dos controles são:

- Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo concorrente;
- Controles negativos concorrentes devem estar dentro do limite de 95% de distribuição do controle histórico negativo do laboratório, podendo ser aceitos valores superiores se houver clareza de que não correspondem a *outliers*.

Resultados falso-positivos podem ser observados pela alteração de pH e osmolaridade, precipitação, interação dos componentes do meio de cultura ou excessiva toxicidade.

A citotoxicidade é uma limitação importante, pois dificulta a interpretação do resultado e, portanto, pode tornar o estudo inconclusivo. Deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados positivos encontrados apenas em doses com valores de sobrevivência iguais ou inferiores a 10%. O resultado não deve ser considerado positivo se ocorrer exclusivamente nessas doses.

Análise e interpretação dos resultados

No ensaio de MLA, as seguintes informações devem ser fornecidas para a avaliação dos resultados: dados individuais por cultura relativos a CTR, CRS e ERC na etapa de seleção de mutantes e o número de colônias mutantes (para a versão em ágar) ou o número de poços vazios (para versão em micropoços). Em caso de resultado positivo, deve-se fornecer adicionalmente FM de colônias pequenas e grandes referentes a pelo menos uma concentração da substância teste (geralmente a maior concentração positiva) e aos controles negativos e positivos. Em caso de resultado negativo, deve-se fornecer apenas FM das colônias pequenas e grandes referentes aos controles negativo e positivo.

No ensaio de TK6, as seguintes informações devem ser fornecidas para a avaliação dos resultados: dados individuais por cultura relativos à SRel, à EC na etapa de seleção de mutantes e ao número de poços vazios para mutantes de aparecimento precoce e tardio. A abordagem para interpretação dos resultados é diferente para cada um dos ensaios. Para o MLA, no lugar da análise estatística geralmente usada, ela se baseia no uso de um valor de FM induzida predefinida (isto é, aumento na FM acima do controle concorrente), chamado Fator Global de Avaliação (*global evaluation factor* – GEF). Assim, a substância teste é considerada claramente positiva se a FM induzida excede o valor de GEF (90×10^{-6} para teste em ágar; 126×10^{-6} para micropoços) e se esse aumento é dose- dependente, utilizando um teste de tendência, por exemplo.

Para o TK6, uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se, em qualquer uma das condições experimentais analisadas:

- Pelo menos uma das concentrações de teste apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente; e
- O aumento for concentração-dependente, quando avaliado com um teste de tendência apropriado; e
- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhuma das concentrações de teste apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não houver aumento concentração-dependente, quando avaliado com um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estiverem dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz mutações. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado, pode ser necessário repetir o experimento com condições experimentais modificadas (por exemplo, espaçamento das concentrações testadas para aumentar a probabilidade de atingir pontos dentro da faixa de 10-20% CTR/SRel; alteração das condições de ativação metabólica ou da duração do tratamento). Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

II) Ensaios *in vitro* de danos cromossômicos

Basicamente, dois tipos de desfechos podem ser usados para determinar se uma substância teste é capaz de causar danos cromossômicos: detecção de aberrações cromossômicas e micronúcleos. Cabe destacar que a maioria dos eventos detectados nesses ensaios não são mutações *per se*, uma vez que aberrações cromossômicas que acometem genes essenciais impedem a viabilidade da célula e, portanto, não são transmitidas às células filhas. Quanto aos micronúcleos, eles são visualizados nas células após a primeira divisão celular, mas não são retidos em todas as gerações subsequentes. No entanto, com base em estudos genéticos que avaliam efeitos herdáveis em humanos e outras espécies, presume-se que um agente químico capaz de induzir aberrações cromossômicas e micronúcleos também pode causar mutações cromossômicas transmissíveis, tais como translocações cromossômicas e aneuploidia (OECD, 2016).

a) Teste de aberração cromossômica em células de mamíferos – Diretriz OECD 473

Considerações iniciais e limitações

Esse teste se destina à detecção de substâncias que causam aberrações cromossômicas estruturais, isto é, decorrentes de eventos clastogênicos (quebras, deleções e rearranjos) e deve ser conduzido em células em metáfase. A maioria das aberrações cromossômicas é observada apenas nas metáfases da primeira ou segunda divisão celular mitótica após a exposição à substância teste. Aberrações estruturais podem afetar cromossomos (lacunas, quebras, anéis, dicêntricos) ou cromátides (quebras e trocas), a depender do mecanismo de ação. As células em diferentes estágios do ciclo celular podem ter sensibilidade variável às substâncias teste e, assim, gerar um padrão particular de aberrações em cromátides *versus* em cromossomos. Por essa razão, é recomendável que as células sejam expostas a produtos químicos durante todo o ciclo celular. Vale ressaltar que o presente teste não deve ser utilizado

para investigar aneuploidia, sendo o ensaio de micronúcleo mais apropriado para essa finalidade.

Princípio do teste

Culturas de células de mamíferos são expostas à substância teste, com ou sem ativação metabólica exógena, a depender da capacidade metabólica da cultura de células utilizada. Em intervalos predeterminados após o início da exposição, as culturas de células são tratadas com uma substância capaz de interromper o ciclo celular na fase de metáfase (por exemplo, Colcemid® ou colchicina). Em seguida, as células são coletadas, coradas e analisadas em microscópio quanto à presença de aberrações do tipo cromatídica e cromossômica.

Detalhamento do método

Tanto em linhagens de cultura de células já estabelecidas – tais como: CHO, CHL, V79 e TK6; quanto em culturas celulares primárias, incluindo linfócitos de sangue periférico provenientes de humanos ou de outros mamíferos; as células devem ser selecionadas com base na capacidade de crescimento em meio de cultura; na estabilidade do cariótipo (incluindo o número de cromossomos), considerando os mecanismos de reparo do DNA (como o *status* P53); na frequência espontânea de aberrações cromossômicas e na ausência de contaminação por Mycoplasma. É necessário que sejam feitas medições da proliferação celular para garantir que um número suficiente de células tratadas alcance a mitose durante o ensaio e que os tratamentos sejam realizados em níveis adequados de citotoxicidade. Os parâmetros recomendados para a avaliação da citotoxicidade estão detalhados no quadro abaixo:

Quadro 5. Parâmetros adotados para a avaliação da citotoxicidade.

Para linhagens celulares

Duplicação relativa da população (*Relative Population Doubling*)

$$\text{RPD}\% = \frac{\text{N}^\circ \text{ duplicação de população cultura tratada}}{\text{N}^\circ \text{ duplicação de população cultura controle}} \times 100)$$

Aumento relativo na contagem de células (*Relative Increase in Cell Count*)

$$\text{RICC}\% = \frac{\uparrow \text{N}^\circ \text{ células cultura tratada [final-inicial]}}{\uparrow \text{N}^\circ \text{ células cultura controle [final-inicial]}} \times 100);$$

Para cultura primária de linfócitos:

Índice mitótico (*mitotic index*)

$$\text{MI}\% = \frac{\text{N}^\circ \text{ células mitóticas}}{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas}} \times 100)$$

Durante a exposição, no mínimo três concentrações da substância teste devem ser utilizadas (excluindo os controles negativo e positivo). Todos os critérios a serem adotados para a escolha dessas concentrações seguem o mesmo racional já descrito no item referente à Diretriz OECD 476 e, portanto, não serão repetidos neste item. Se a concentração máxima for baseada na citotoxicidade, ela deve ter como objetivo atingir 55

$\pm 5\%$ de citotoxicidade usando os parâmetros de citotoxicidade recomendados (ou seja, redução no RICC e RPD para linhagens celulares e redução do MI para culturas primárias de linfócitos para $45 \pm 5\%$ do controle negativo concorrente).

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se incluir em cada ensaio controles concorrentes negativos (solvente) e positivos. Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo concorrente.
- A menos que uma condição experimental já seja suficiente para gerar um resultado positivo, devem ser testadas as três condições a seguir: exposição de curto prazo (3-6 horas) à substância teste com e sem ativação metabólica; e exposição de longo prazo (de forma contínua até o momento da amostragem) sem ativação metabólica. Nos três casos, a amostragem das células deve ser feita em um intervalo de tempo equivalente a 1,5 da duração normal do ciclo celular após o início da exposição.
- Deve-se proceder com a seleção adequada do número de células e das concentrações a serem testadas, com base nos critérios de concentração máxima supracitados.
- Deve-se realizar os ensaios em níveis adequados de citotoxicidade que não comprometam a avaliação do resultado.
- Deve-se analisar, no mínimo, 300 metáfases para cada concentração testada e para o grupo controle. Esse número pode ser reduzido quando se observa uma grande quantidade de células com aberrações cromossômicas, sendo a substância teste considerada claramente positiva.
- Devem ser contabilizadas células com aberrações incluindo e excluindo as lacunas. Aberrações nas cromátides e nos cromossomos devem ser contabilizadas separadamente.

Análise e interpretação dos resultados

Na apresentação dos resultados, as aberrações do tipo cromossômica e cromatídica, classificadas por subtipos (quebras, trocas) devem ser listadas separadamente, com dados dos números e frequências individuais para cada cultura tratada e de controle.

Uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se, em qualquer uma das condições experimentais analisadas:

- Pelo menos uma das concentrações de teste apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo

concorrente;

- O aumento for concentração-dependente, quando avaliado com um teste de tendência apropriado;
- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em Poisson).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhuma das concentrações testadas apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não houver aumento concentração-dependente, quando avaliado por um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estiverem dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em Poisson).

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz aberrações cromossômicas. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado, pode ser necessário analisar mais células ou repetir o experimento com condições experimentais modificadas (por exemplo, espaçamento das concentrações testadas, alteração das condições de ativação metabólica). Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

b) Teste de micronúcleo em células de mamíferos – Diretriz OECD 487

Considerações iniciais e limitações

O teste de micronúcleo *in vitro* se destina à identificação de compostos químicos clastogênicos (que promovem quebras cromossômicas) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), o que é efetuado por meio da detecção de micronúcleos (MN) no citoplasma de células interfásicas. O MN corresponde à estrutura de DNA formada por fragmentos de cromossomo – identificado sem centrômero e indicativo de evento clastogênico; ou pelo cromossomo inteiro – identificado com centrômero e indicativo de evento aneugênico; os quais não migram para os polos na etapa de anáfase durante a divisão celular e, portanto, não são incorporados ao núcleo de células-filhas. A diferenciação entre esses eventos é feita

por métodos adicionais de marcação imunoquímica dos cinetócoros ou por hibridação com sondas centroméricas/teloméricas (hibridação fluorescente *in situ* ou “FISH”).

Trata-se de em um ensaio robusto e de rápida análise, uma vez que esta consiste basicamente na determinação do número de células binucleadas e pode ser feita de forma automatizada, por meio de técnicas de citometria de fluxo, citometria por varredura a laser ou análise de imagem. No entanto, esse teste não permite a identificação de translocações e outros rearranjos cromossômicos complexos, os quais podem ser visualizados no ensaio de aberração cromossômica descrito anteriormente.

Princípio do teste

Esse ensaio consiste na exposição de culturas de células de mamíferos à substância teste na presença ou ausência de uma fonte exógena de ativação metabólica, a qual deve ocorrer durante a mitose para possibilitar a indução de aneuploidia. Durante ou após essa exposição, as células devem crescer por um período suficiente para que haja dano cromossômico ou outros efeitos no ciclo celular. Isso acarreta a formação de MN em células interfásicas, as quais são posteriormente coletadas, coradas e analisadas.

Detalhamento do método

Nesse estudo, pode-se utilizar tanto linhagens de cultura de células de roedores (CHO, CHL, V79, L5178Y) e de humanos (TK6); quanto linfócitos de sangue periférico provenientes de humanos ou de outros mamíferos. Essa seleção deve ocorrer com base na capacidade de crescimento em meio de cultura, na estabilidade do cariótipo (incluindo o número de cromossomos) e na frequência espontânea de formação de MN. Considerando que células em diferentes estágios do ciclo celular podem ter sensibilidade variável às substâncias testadas, é recomendável que a exposição seja efetuada durante todo o ciclo celular.

A quantificação dos MN é geralmente realizada na primeira intérfase posterior à primeira divisão celular concluída após a etapa de exposição. Assim, o fator mais crítico para esse ensaio é garantir que as células analisadas completaram a mitose durante o tratamento ou no período de incubação pós-tratamento. Isso pode ser auxiliado com o uso de citocalasina B (citoB), agente bloqueador da citocinese, o qual impede a separação das células-filhas após a mitose e resulta na formação de células binucleadas. Ou seja, o tratamento de culturas com esse agente e a medição das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas na cultura consistem em um método preciso para quantificar o efeito da exposição à substância teste sobre a proliferação celular e sua citotoxicidade, além de garantir que apenas as células que se dividiram durante ou após o tratamento serão quantificadas. A citotoxicidade pode ser avaliada por meio do Índice de Proliferação de Bloqueio de Citocinese (IPBC) ou do Índice de Replicação (IR) de pelo menos 500 células por cultura tratada, em comparação ao controle. Caso a cito B não seja utilizada, é necessário

demonstrar que ocorreu divisão das células em cultura, a fim de evitar resultados falso-negativos. Nessa segunda condição, a citotoxicidade pode ser avaliada por meio do RPD ou RICC, já detalhados no item referente à Diretriz OECD 473.

Durante a exposição, no mínimo três concentrações da substância teste devem ser utilizadas (excluindo o solvente e os controles positivos). Todos os critérios a serem adotados para a escolha dessas concentrações seguem o mesmo racional já descrito no item referente à Diretriz OECD 476 e, portanto, não serão repetidos neste item.

Com relação ao período de exposição das culturas de células, o início e o término devem ocorrer enquanto as células estão crescendo exponencialmente e as células devem permanecer crescendo até o momento da amostragem. Portanto, esse esquema de tratamento para linhagens celulares e culturas de células primárias pode diferir um pouco daquele aplicado a linfócitos, pois estes requerem estimulação mitogênica para iniciar seu ciclo celular. Assim, uma abordagem mais eficiente para linfócitos é iniciar a exposição à substância teste entre 44 e 48 horas após a estimulação com o mitógeno fito-hemaglutinina, momento em que as células se dividirão de forma assíncrona.

Vale ressaltar que os cronogramas de exposição gerais previstos na Diretriz OECD 487 podem ser modificados – desde que devidamente justificados – a depender da estabilidade ou reatividade da substância teste, assim como das características específicas de crescimento das células utilizadas.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se incluir em cada ensaio controles concorrentes negativos (solvente) e positivos. Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo concorrente.
- A menos que uma condição experimental já seja suficiente para gerar um resultado positivo, devem ser testadas as três condições a seguir: exposição de curto prazo (3-6 horas) à substância teste com e sem ativação metabólica; e exposição de longo prazo (de forma contínua até o momento da amostragem) sem ativação metabólica. Nos três casos, a amostragem das células deve ser feita em um intervalo de tempo equivalente a 1,5 - 2,0 da duração normal do ciclo celular após o início da exposição.
- Deve-se proceder com a seleção adequada do número de células e das concentrações a serem testadas, com base nos critérios de concentração máxima – deve ter como objetivo atingir $55 \pm 5\%$ de citotoxicidade usando os parâmetros recomendados (ou seja, RICC e RPD quando a citoB não é utilizada; e IPBC ou IR com o uso da citoB).
- Para todos os protocolos, é importante demonstrar que a proliferação celular

ocorreu nas culturas controle e tratada, e que a extensão da citotoxicidade induzida pela substância teste foi avaliada em todas as culturas nas quais os MN foram quantificados.

Análise e interpretação dos resultados

Após coleta e coloração das células, a frequência de MN deve ser analisada em pelo menos 2000 células binucleadas para cada concentração testada e no grupo controle, igualmente divididas entre as replicatas, caso sejam utilizadas. Se houver disponibilidade de um número menor que esse para quantificação em cada concentração, e se não for detectado um aumento significativo nos MN, o ensaio deve ser repetido usando mais células ou concentrações de menor citotoxicidade. Células binucleadas com formas irregulares ou onde os dois núcleos diferem muito em tamanho não devem ser incluídas na contagem.

Uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se, em qualquer uma das condições experimentais analisadas:

- Pelo menos uma das concentrações de teste apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente;
- O aumento for concentração-dependente em pelo menos uma condição experimental testada, quando avaliado com um teste de tendência apropriado;
- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhuma das concentrações testadas apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não houver aumento concentração-dependente quando avaliado por um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estiverem dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*);

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e

a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento fraco ou limítrofe), pode ser necessário analisar mais células ou repetir o experimento com condições experimentais modificadas. Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

7.2.2.2 Ensaios *in vivo*

Esses ensaios são relevantes para os casos em que a identificação da ação mutagênica depende do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparo e de síntese translesão de DNA, apesar da variação que pode ocorrer entre espécies, entre tecidos e entre os tipos de danos ao DNA. Assim, diferentes respostas genotóxicas podem ser obtidas utilizando diferentes espécies. De modo geral, um ensaio *in vivo* para mutações gênicas é útil para uma investigação mais aprofundada de um efeito mutagênico detectado por um sistema *in vitro*, assim como para acompanhar resultados de testes usando outros desfechos *in vivo* (ECHA, 2017).

A fim de atender aos princípios dos 3Rs (*Reduce, Replace, Refine*), a combinação de estudos de genotoxicidade *in vivo* ou a integração de tais estudos em estudos de toxicidade após exposição repetida, sempre que possível e cientificamente justificada, é fortemente encorajada. É possível investigar dois ou mais desfechos em um único estudo *in vivo*, economizando assim recursos e reduzindo o número de animais utilizados. Por exemplo, o ensaio cometa e o teste de micronúcleo *in vivo* podem ser combinados em um único estudo agudo, embora seja necessária alguma modificação dos tempos de exposição e amostragem. Esses mesmos desfechos também podem ser investigados em integração a estudos de toxicidade por dose repetida (por exemplo, de 28 dias) (ECHA, 2017). Ainda, conforme será abordado no tópico específico, o ensaio Pig-a (OECD 470) também pode ser integrado em estudos de toxicidade por dose repetida e diferentes protocolos existem para combiná-lo com os testes de micronúcleo e ensaio cometa.

Para garantir que seja mantido ao mínimo o número de animais utilizados nos testes de genotoxicidade em células somáticas, machos e fêmeas não devem ser automaticamente usados. De acordo com diretrizes padrão, testar em apenas um sexo é possível quando os dados disponíveis sobre a substância teste, incluindo, por exemplo, dados de estudo preliminar de seleção de doses, não demonstram diferenças relevantes relativas ao sexo (como na toxicidade sistêmica, toxicidade de órgão-alvo, metabolismo ou biodisponibilidade) (ECHA, 2017).

É importante considerar que alguns dos ensaios *in vivo* aqui descritos utilizam protocolos limitados à avaliação em um tecido específico (a medula óssea nos ensaios de aberração cromossômica, por exemplo). Já os ensaios de mutação gênica em células somáticas e germinativas de roedores transgênicos e o ensaio cometa empregam métodos que possibilitam que qualquer tecido (contendo células nucleadas)

de um animal pode, em teoria, ser examinado quanto a efeitos no material genético. Isso permite a análise de tecidos-alvo distantes (incluindo células germinativas) e tecidos no local de contato (ou seja, pele, epitélio do trato respiratório ou gastrointestinal). No entanto, podem existir diferenças quanto ao número e tipo de tecidos para os quais o uso de um teste específico foi cientificamente validado (ECHA, 2017).

I. Ensaios *in vivo* de mutação gênica

Para os ensaios *in vivo*, conforme recomendado pelas diretrizes da OECD, é importante que os estudos regulatórios considerem as vias em que se espera exposição humana. Contudo, para fins de avaliação do peso da evidência, estudos conduzidos por todas as vias serão incluídos na análise para a conclusão sobre o potencial mutagênico da substância.

a) Ensaios de mutação gênica em células germinativas e somáticas de roedores transgênicos – Diretriz OECD 488

Considerações iniciais e limitações

Esse ensaio identifica substâncias químicas que induzem mutações ou rearranjos cromossômicos em genes repórteres de camundongos ou ratos transgênicos, os quais possuem múltiplas cópias de plasmídeos ou fagos integrados ao cromossomo, tanto em células somáticas quanto germinativas. As mutações são medidas pela recuperação do transgene e análise do fenótipo do gene repórter em bactérias. As mutações pontuadas nos ensaios de mutação *lacI*, *lacZ*, *cII* e *gpt* consistem principalmente em substituição de pares de bases, deslocamento de quadro de leitura e pequenas inserções/deleções. A proporção relativa desses tipos de mutação entre as mutações espontâneas é semelhante à observada no gene endógeno *Hprt*. Deleções maiores e rearranjos cromossômicos só podem ser detectados com os modelos *Spi^r* e plasmídeo *lacZ*.

É importante destacar ainda que os ensaios descritos nesse tópico são adequados para a investigação de mutação gênica em células germinativas masculinas, nas quais o tempo e a cinética da espermatogênese são bem definidos. Nas células femininas, os baixos números de óvulos disponíveis para análise, mesmo após superovulação, e o fato de não haver síntese de DNA nos ovócitos, impedem a determinação da mutação usando ensaios transgênicos.

Princípio do teste

O experimento basicamente envolve a exposição do rato ou camundongo transgênico à substância teste por determinado tempo e pela via de escolha. Essa etapa de administração é seguida pelo tempo de manifestação, tempo de fixação ou tempo de expressão, isto é, um período durante o qual lesões de DNA não reparadas são fixadas em mutações estáveis. Em seguida, no tempo de amostragem, o animal sofre eutanásia

e tem o seu DNA genômico isolado do(s) tecido(s) de interesse e purificado. A FM é calculada por meio da divisão do número de placas/plasmídeos contendo mutações no transgene pelo número total de placas/plasmídeos recuperados da mesma amostra de DNA.

Detalhamento do método

Os animais transgênicos mais utilizados para esse ensaio são: camundongos com bacteriófago contendo um gene repórter *lacZ* (*MutaMouse*); camundongos com plasmídeo *lacZ*; camundongos e ratos com genes delta *gpt* (*gpt* e *Spi-*); camundongos e ratos com gene repórter *lacI* (*Big Blue*).

A administração deve ser efetuada por uma via representativa da exposição humana, em um regime de dose repetida, com tratamentos diários por um período de 28 dias. As alterações nesse período padrão devem ser cientificamente embasadas e justificadas na descrição do protocolo. As doses utilizadas nesse ensaio devem ser escolhidas com base em um estudo de seleção de doses – conduzido pela mesma via de exposição – ou nos resultados de estudos de toxicidade subaguda pré-existentes. Deve-se abranger uma faixa a partir de pouca ou nenhuma toxicidade até a dose máxima tolerada (DMT). Vale ressaltar que um estudo completo com três níveis de dose pode não ser necessário, caso seja verificado no momento da seleção das doses que um regime de tratamento na dose limite não produz efeitos tóxicos observáveis; e que a genotoxicidade não é esperada com base em dados de substâncias estruturalmente relacionadas. Essa dose limite é de 1000 mg/kg de peso corporal/dia, para o período padrão de tratamento (28 dias). Para períodos de 14 dias ou menos, devidamente justificados, a dose limite é de 2000 mg/kg peso corporal/dia.

Duas variáveis críticas a serem definidas no ensaio são: 1) o tempo de amostragem – o qual é determinado pelo período necessário para a fixação das mutações; 2) e o tecido a ser coletado – definido com base em fatores como via de administração ou local de primeiro contato, parâmetros farmacocinéticos de distribuição/ acumulação tecidual e mecanismo de ação da substância. O tempo de amostragem é específico para cada tecido e parece estar relacionado ao tempo de *turnover* da população celular. Com base nisso, para células somáticas, uma abordagem adequada para englobar a medição de FM tanto em tecidos de proliferação rápida quanto lenta seria 28 dias de tratamento consecutivos, com amostragem em 28 dias após o tratamento final (28 + 28 dias). A coleta de tecidos em três dias após o tratamento final (ou seja, 28 + 3 dias), conforme recomendado nas versões anteriores dessa diretriz, continua sendo um período de amostragem válido quando não são necessários dados de células germinativas.

Quanto às células germinativas masculinas, elas podem ser coletadas como espermatozoides maduros (na porção caudal do epidídimo) ou como células germinativas em desenvolvimento (nos túbulos seminíferos). O tempo para a

progressão do desenvolvimento de células germinativas desde células-tronco espermatogoniais expostas até espermatozoides maduros que atingem o epidídimo caudal é de aproximadamente 49 dias em camundongos e 70 dias em ratos. Desse modo, não se deve realizar a amostragem de espermatozoides caudais de camundongos e ratos utilizando o regime de 28 + 3 dias, pois nesse intervalo de amostragem será coletada uma população de células germinativas que não sofreu replicação de DNA durante a exposição e, portanto, não serão obtidos dados significativos de mutagenicidade. Assim, tal amostragem deve ser realizada, no mínimo, em 49 (camundongo) ou 70 (ratos) dias após o término dos 28 dias de exposição, nos casos em que é importante avaliar mutações nas espermatogônias.

Já as células germinativas coletadas nos túbulos seminíferos compreendem uma população mista de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Embora resultados positivos verificados nas células germinativas tubulares após um regime de 28 + 3 dias sejam informativos, um resultado negativo após esse mesmo regime é insuficiente para excluir o potencial mutagênico de um composto, porque apenas uma fração limitada das células germinativas coletadas foi exposta durante a fase proliferativa da espermatogênese. Assim, em camundongos por exemplo, o regime de 28 + 28 dias permite a avaliação de mutações em uma população de células germinativas que recebeu 99,6% dos 28 dias de tratamento durante a fase proliferativa da espermatogênese (sendo apenas 42,2% no regime 28 + 3 dias). Em ratos, devido à maior duração da espermatogênese, esse regime de 28 + 28 dias permite a avaliação de mutações em uma população de células que recebeu 80,3% dos 28 dias de tratamento durante a fase proliferativa da espermatogênese (sendo apenas 21,6% com o regime 28 + 3 dias). Então, embora o regime de 28+28d forneça em ratos um menor grau de exposição da fase proliferativa comparado aos camundongos, tal protocolo é considerado adequado para a avaliação da mutagênese em células germinativas de ambas as espécies. Entretanto, o impacto dessa exposição potencial total inferior em ratos deve ser considerado ao avaliar os resultados obtidos com esse protocolo.

A utilização de intervalos de amostragem diferentes de 28 dias também pode ser aceitável, desde que seja considerado e cientificamente justificado o impacto da utilização de um tempo de amostragem inferior a 28 dias, o que acarreta a redução do grau de exposição dos estágios de proliferação de células germinativas, tanto para camundongos quanto para ratos. Nos casos em que se deve coletar e/ou testar tanto células somáticas quanto germinativas, o regime 28 + 28 dias permite o teste de mutações em tecidos somáticos e em células germinativas tubulares dos mesmos animais.

Por fim, com relação aos métodos de medição, há recomendações específicas referenciadas para a detecção de mutantes em cada um dos modelos transgênicos citados anteriormente, que devem seguir as descrições das referências citadas pela Diretriz OECD 488. Vale ressaltar que o número ideal de placas ou colônias por amostra

de DNA é determinado pela probabilidade estatística de detecção de um número suficiente de mutantes em dada FM espontânea. Em geral, é necessário no mínimo 125.000 a 300.000 placas, se a FM espontânea for da ordem de 3×10^{-5} .

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se incluir, em cada ensaio, controles concorrentes negativos (solvente) e positivos. Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo concorrente. Em casos de comprovada competência e uso rotineiro desses ensaios pelo laboratório, é possível a utilização de DNA proveniente de controles positivos anteriores, desde que obtidos da mesma espécie e tecidos de interesse. Controles negativos, tratados apenas com solvente ou veículo, devem ser incluídos em cada amostragem e seus dados devem ser considerados aceitáveis para adição à base de dados de controle histórico do laboratório.
- Utilização de grupos com no mínimo cinco animais. No entanto, se o poder estatístico for insuficiente, o número de animais deve ser aumentado conforme requerido.
- Análise de um número adequado de níveis de dose, de animais por dose e de unidades formadoras de placas (ufp) ou unidades formadoras de colônias (ufc); além da seleção adequada do tempo de amostragem, do tecido a ser coletado e da via de administração, conforme detalhamento acima descrito.

Análise e interpretação dos resultados

A avaliação da significância biológica deve ser primeiramente considerada. Entretanto, testes estatísticos podem ser utilizados como ferramenta para avaliação dos resultados. Nos testes estatísticos, deve-se considerar o animal como unidade experimental. No relatório, devem ser incluídos: 1) número total de ufp ou ufc; 2) número de mutantes e a FM para cada tecido de cada animal. Caso seja executado o sequenciamento de DNA, os resultados devem ser apresentados para cada mutante analisado, bem como os cálculos de FM resultantes para cada animal e tecido.

Uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se todos os critérios a seguir forem atendidos em um determinado tecido:

- Pelo menos um dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo na FM em comparação ao controle negativo concorrente;
- O aumento na FM for dose-dependente quando avaliado com um teste de tendência apropriado (não aplicável ao ensaio limite);

- O aumento na FM de qualquer grupo exposto estiver fora do limite superior da distribuição apropriada de controle negativo histórico.

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se todos os critérios a seguir forem atendidos em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhum dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo na FM em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não for observado aumento dose-dependente quando avaliado por um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estiverem dentro dos limites superior e inferior da distribuição dos dados de controle negativo histórico;
- Há evidências de adequada exposição do tecido-alvo à substância teste ou aos seus metabólitos.

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz mutação gênica no tecido analisado. Evidências de exposição do tecido-alvo à substância teste ou aos seus metabólitos podem ser obtidas a partir de dados de toxicidade geral (por exemplo, redução do peso corporal/ peso órgão), ou de dados morfológicos ou histopatológicos obtidos a partir de análises no mesmo estudo, ou em estudos de toxicidade comparáveis, ou ainda em outros estudos de genotoxicidade *in vivo*. Alternativamente, dados toxicocinéticos, obtidos no mesmo estudo ou em um estudo independente usando a mesma via de administração e a mesma espécie animal, podem ser usados para comprovar a exposição tecidual.

Não há exigência de verificação adicional para uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, ou no caso de um resultado positivo na única dose utilizada num teste limite, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento fraco ou limítrofe), investigações adicionais dos experimentos existentes podem ser necessárias. Isso inclui a análise de mais placas ou colônias mutantes e a análise de mais animais. Caso isso ainda seja insuficiente para concluir que uma resposta é positiva ou negativa, poderá ser necessário repetir o ensaio utilizando condições experimentais modificadas. Adicionalmente, pode ser útil realizar o sequenciamento de DNA das placas mutantes para determinar se existe uma alteração no espectro de mutação induzida pela substância teste. Isto é, diferenças no espectro de mutação entre as colônias mutantes verificadas nos grupos exposto e controle negativo podem dar suporte a um efeito mutagênico. Tal sequenciamento pode também ajudar a identificar mutações *jackpot* (ocorrência de um grande número de mutantes que surgem por meio de expansão clonal a partir de uma única mutação).

Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

b) Ensaio de mutação no gene Pig-a em eritrócitos de mamíferos – Diretriz OECD 470

Considerações iniciais e limitações

Esse ensaio utiliza um gene endógeno de mamíferos – fosfatidilinositol glicano classe A (*phosphatidylinositol glycan class A* – Pig-a) – como repórter da mutação gênica em células somáticas. Ele é capaz de detectar mutações induzidas (em sua maioria, substituições de pares de bases e deslocamento de quadro de leitura) em células precursoras eritróides, as quais em roedores adultos são encontradas principalmente na MO.

Em atendimento aos princípios dos 3Rs, esse ensaio pode ser facilmente integrado a outros protocolos de exposição repetida, tais como: estudos de toxicidade repetida por 28 dias (OECD 407 e OECD 412); ensaio de mutação gênica em roedores transgênicos (OECD 488); e estudos de toxicidade subcrônica (OECD 408 e OECD 413). Ainda, o ensaio Pig-a e o teste de micronúcleo em eritrócitos podem ser integrados em um experimento único, uma vez que apenas pequenos volumes de sangue periférico são necessários para a análise de cada desfecho. Assim, tanto a clastogenicidade/aneugenicidade (teste de micronúcleo) quanto a mutação gênica (ensaio Pig-a) podem ser avaliadas no mesmo estudo.

O ensaio Pig-a é sensível tanto a mutágenos de ação direta, quanto àqueles que requerem ativação metabólica para induzir mutação (ou seja, promutágenos). Contudo, esse ensaio não é aplicável para avaliar a mutagenicidade de compostos que não alcançam a medula óssea. Ou seja, em geral, o ensaio Pig-a não é capaz de investigar a genotoxicidade no local de primeiro contato.

Princípio do teste

A proteína codificada pelo gene Pig-a é necessária na biossíntese de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes na membrana celular. Dos aproximadamente 30 genes envolvidos na síntese de GPI, Pig-a é o único localizado no cromossomo X e, como há apenas um cromossomo X em machos e um cromossomo X funcional em fêmeas, uma única mutação tem o potencial de inativar o produto desse gene, resultando em células deficientes em âncoras GPI e nas suas proteínas ancoradas. Assim, animais machos e fêmeas são igualmente sensíveis à indução de mutação no gene Pig-a.

Eritrócitos e reticulócitos do sangue periférico são analisados por citometria de fluxo para o fenótipo mutante Pig-a (ou seja, perda de âncoras de GPI), por meio da marcação com anticorpos conjugados com fluorocromo para detecção de proteínas

ancoradas em GPI. Assim, as células mutantes Pig-a não apresentarão marcação fluorescente, enquanto as células Pig-a do tipo selvagem apresentarão fluorescência.

Tanto a população de reticulócitos quanto de eritrócitos total devem ser avaliadas quanto ao fenótipo mutante. Frequências aumentadas de reticulócitos mutantes (MUT RET) aparecem mais cedo na circulação sanguínea periférica em comparação aos eritrócitos mutantes (MUT RBC). Ainda assim, é importante quantificar ambos os tipos celulares porque MUT RBC representam um importante indicador confirmatório tardio de mutação. A demonstração da mutação em ambos representa a evidência mais forte de atividade mutagênica induzida pela substância teste e os regimes de exposição e amostragem sanguínea foram delineados para proporcionar tempo suficiente para tanto MUT RET quanto MUT RBC sofrerem aumento induzido pela exposição a compostos mutagênicos.

Detalhamento do método

A administração deve ser conduzida por uma via representativa da exposição humana, na qual se garanta o alcance do tecido alvo (medula óssea) pela substância teste. Então, recomenda-se a utilização da via oral (por gavagem, alimentos ou água). As demais vias de administração (tópica, subcutânea, intravenosa, inalatória, intratraqueal, implantação) podem ser empregadas quando justificadas cientificamente.

As doses utilizadas devem ser escolhidas com base em um estudo de seleção de doses – conduzido no mesmo laboratório, usando a mesma espécie, linhagem e sexo, pela mesma via e regime de exposição usados no estudo principal; ou nos resultados de estudos de toxicidade subaguda pré-existent. A fim de se obter informações sobre dose-resposta, o estudo completo deve incluir um grupo controle negativo concorrente e, no mínimo, três níveis de dose geralmente separados por um fator de 2, mas não superior a 4. Para compostos que não induzem toxicidade, ou que não são limitados por outros fatores (por exemplo, palatabilidade para administração via dieta ou água), a maior dose administrada por um período igual ou superior a 14 dias deve ser de 1000 mg/kg p.c./dia; e para períodos inferiores a isso deve ser de 2000 mg/kg p.c./dia. Porém, se for verificada toxicidade, deve-se utilizar a DMT e doses inferiores até níveis que causem pouca ou nenhuma toxicidade.

A maior dose também pode ser definida com base na toxicidade para a medula óssea. Quando esta evidência é fornecida por uma redução na média do %RET (relativo à média do controle negativo concorrente medido, por exemplo, com amostras de sangue de 1-3 dias após um esquema de dosagem de 28 dias), a redução deve ser estatisticamente significativa, mas idealmente não deve exceder 80%. Isto ocorre porque novos eritrócitos precisam ser gerados para manifestar um efeito induzido pela substância teste.

Vale ressaltar que um estudo completo com três níveis de dose pode não ser necessário caso se verifique, a partir da avaliação de outros dados, que um regime de exposição na dose limite não produz efeitos tóxicos observáveis, incluindo nenhuma

redução da proliferação da medula óssea ou outra evidência de citotoxicidade do tecido alvo; e que a genotoxicidade não é esperada com base em dados de estudos *in vitro* e de substâncias estruturalmente relacionadas. Essa dose limite também é de 1000 mg/kg de peso corporal/dia, quando o tratamento dura 14 dias ou mais; e de 2000 mg/kg peso corporal/dia, para períodos inferiores a 14 dias. No caso de exposição inalatória, as concentrações limite são 20 mg/L, 5 mg/L ou 20000 ppm para vapores, aerossóis e gases, respectivamente.

Quanto ao regime de exposição e amostragem, recomenda-se um protocolo de dose repetida por 28 dias consecutivos, com coleta de sangue periférico (menos de cerca de 300 µl) pelo menos uma vez, dentro de um período de horas a dias após o término da exposição (por exemplo, entre os dias 28-31). Podem ser utilizados esquemas alternativos, se cientificamente justificados, especialmente nos casos em que facilitam a integração com outros estudos toxicológicos ou a combinação com outros testes de genotoxicidade.

Deve-se registrar os sinais clínicos diariamente e verificar a morbi-mortalidade, no mínimo, duas vezes ao dia. Dados de pesagem e consumo de alimentos devem ser registrados, no mínimo, semanalmente.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se utilizar grupos de, no mínimo, 6 animais, se somente um dos sexos for empregado. Caso dados prévios indiquem diferenças relevantes entre machos e fêmeas (por exemplo, na toxicidade sistêmica, no metabolismo e na biodisponibilidade), é indicada a realização do estudo em ambos os sexos, com um mínimo de 6 animais/ sexo/ grupo.
- Deve-se incluir grupos controle negativo concorrentes em cada intervalo de amostragem e suas frequências de MUT RET e MUT RBC devem ser consistentes com a distribuição histórica de controle negativo.
- Quando utilizados, grupos controle positivo concorrentes devem induzir um aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo concorrente. Todavia, controles positivo concorrentes podem ser dispensados quando a proficiência do laboratório for devidamente comprovada, com estabelecimento de uma faixa de controle histórico.
- Padrões biológicos de citometria de fluxo devem ser incluídos em cada análise, representando um tipo útil de controle analítico compatível com os princípios 3R.
- Deve-se seguir adequadamente o regime de exposição e amostragem, utilizando via de exposição e níveis de dose indicados, com base nos critérios de dose máxima supracitados.
- Deve-se analisar um número apropriado de MUT RBC e MUT RET (em geral,

um mínimo de $1-3 \times 10^6$ eritrócitos e $1-3 \times 10^6$ reticulócitos por animal em cada intervalo de amostragem).

- Deve-se fornecer evidências de que a substância teste alcançou a medula óssea, como: detecção de níveis plasmáticos da substância teste e/ou do(s) seu(s) metabólito(s); alterações significativas (aumento ou redução) no %RET em relação ao grupo controle negativo concorrente, indicando toxicidade da medula óssea; ou dados toxicocinéticos, obtidos em um estudo independente utilizando a mesma via de administração e a mesma espécie (ou uma espécie diferente, desde que justificado), podem ser utilizados para demonstrar a exposição da medula óssea.

Análise e interpretação dos resultados

Deve-se informar separadamente o número e a frequência de reticulócitos, eritrócitos, MUT RET e MUT RBC quantificados para cada animal em cada intervalo de amostragem. Além disso, deve-se também relatar dados sobre toxicidade geral e sinais clínicos.

Com relação à interpretação dos resultados, uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se todos os seguintes critérios forem atendidos:

- Pelo menos um dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo em ambas as frequências de MUT RET e MUT RBC em comparação ao controle negativo concorrente;
- O aumento for dose-dependente, por exemplo quando avaliado com um teste de tendência adequado (não aplicável ao teste limite);
- As frequências de MUT RET e MUT RBC de qualquer um dos grupos expostos (em qualquer intervalo de amostragem) excedem o limite superior da distribuição dos dados de controle negativo histórico.

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se todos os seguintes critérios forem atendidos em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhum dos grupos expostos apresenta um aumento estatisticamente significativo nas frequências de MUT RET e MUT RBC em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não há aumento dose-dependente em nenhuma das respostas de frequência de mutação, quando avaliadas por um teste de tendência apropriado (não aplicável ao teste limite);
- Nenhuma das frequências de MUT RET ou MUT RBC em qualquer grupo exposto excede o limite superior da distribuição dos dados de controle negativo histórico;
- Há evidências de adequada exposição da medula óssea à substância teste.

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a

substância teste não induz mutação no gene Pig-a. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado, pode ser necessário analisar mais células ou repetir o experimento com condições experimentais modificadas (diferentes linhagens, via de administração, intervalo de amostragem, dentre outros). Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

II. Ensaios *in vivo* de danos cromossômicos

a) Teste de micronúcleo em eritrócito de mamíferos – Diretriz OECD 474

Considerações iniciais e limitações

Esse teste é utilizado na detecção de substâncias químicas que causam danos citogenéticos, os quais resultam na formação de MN em eritrócitos coletados na medula óssea (geralmente medidos em eritrócitos imaturos) ou no sangue periférico dos animais (geralmente medidos em reticulócitos). A detecção de MN é facilitada nessas células por serem anucleadas. Os MN podem se originar a partir de cromossomos inteiros ou de seus fragmentos. O aumento na frequência de eritrócitos imaturos micronucleados em animais tratados indica, portanto, a ocorrência de eventos clastogênicos (detecção de MN sem centrômeros) ou aneugênicos (detecção de MN com centrômeros) induzidos pela substância teste. A diferenciação desses eventos pode ser feita por meio de FISH e coloração para DNA centromérico.

Princípio do teste

Esse teste consiste basicamente na exposição dos animais à substância teste por via apropriada e, após um período adequado para que ocorra a indução da formação de MN, é efetuada a coleta das células da medula óssea (por meio da eutanásia dos animais) ou do sangue periférico (por meio de coleta simples). Em seguida, é feita a preparação, coloração e análise dessas células, por meio de microscopia ou de forma automatizada (citometria de fluxo, citometria por varredura a laser ou plataformas de análise de imagem).

Detalhamento do método

Esse ensaio deve ser conduzido preferencialmente em roedores, com a possibilidade de emprego de outros mamíferos, quando devidamente justificado. A administração deve ser conduzida por uma via representativa da exposição humana, sendo a via oral por gavagem a mais comum. As doses utilizadas devem ser escolhidas com base em um estudo de seleção de doses – conduzido no mesmo laboratório, usando a mesma espécie, linhagem e sexo, pela mesma via de exposição e regime de

tratamento usados no estudo principal; ou nos resultados de estudos de toxicidade subaguda pré-existentes.

A fim de se obter informações sobre dose-resposta, o estudo completo deve incluir um grupo controle negativo e, no mínimo, três níveis de dose, geralmente separados por um fator de 2, mas não superior a 4. Se for demonstrado, no estudo preliminar de seleção de doses ou em dados toxicológicos pré-existentes, que a substância teste não produz toxicidade, a maior dose administrada por um período igual ou superior a 14 dias deve ser de 1000 mg/kg peso corporal/dia; e para períodos inferiores a 14 dias, deve ser de 2000 mg/kg peso corporal/dia. Porém, se for verificada toxicidade, deve-se utilizar a DMT e doses inferiores até níveis que causem pouca ou nenhuma toxicidade.

Vale ressaltar que um estudo completo com três níveis de dose pode não ser necessário, caso seja verificado no momento da seleção das doses que um regime de tratamento na dose limite não produz efeitos tóxicos observáveis, incluindo nenhuma redução da proliferação da medula óssea ou outra evidência de citotoxicidade do tecido alvo; e que a genotoxicidade não é esperada com base em dados de estudos *in vitro* e de substâncias estruturalmente relacionadas. Essa dose limite também é de 1000 mg/kg de peso corporal/dia, quando o tratamento dura 14 dias ou mais; e de 2000 mg/kg peso corporal/dia, para períodos inferiores a 14 dias.

A maior dose também pode ser definida com base na citotoxicidade, verificada por exemplo pela redução na proporção de eritrócitos imaturos (eritrócitos normocromáticos) em relação ao total de eritrócitos na medula óssea ou no sangue periférico, devendo essa redução ser superior a 50%, mas não inferior a 20% do valor verificado para o grupo controle. Para exposição igual ou inferior a 5 dias, a maior dose pode ser definida como aquela que provoca uma redução estatisticamente significativa na proporção de eritrócitos imaturos positivos para CD71 entre os eritrócitos totais, mas não para menos que 5% do valor de controle.

Com relação ao esquema de tratamento, é possível a adoção de uma das três opções abaixo:

- Tratamento único seguido por coleta de: a) medula óssea, pelo menos duas vezes (de grupos independentes de animais), com início após 24 horas, mas sem exceder 48 horas pós-tratamento; ou b) sangue periférico, pelo menos duas vezes (do mesmo grupo de animais), com início após 36 horas, mas sem exceder 72 horas pós-tratamento.
- 2 tratamentos diários, em intervalos de 24 horas, seguidos por coleta de: a) medula óssea, uma vez entre 18 e 24 horas pós-tratamento final; ou b) sangue periférico, uma vez entre 36 e 48 horas pós-tratamento final.
- Três ou mais tratamentos diários, em intervalos de aproximadamente 24 horas, seguidos por coleta de: a) medula óssea, no máximo 24 horas pós-tratamento final; ou b) sangue periférico, no máximo 40 horas pós-

tratamento final.

O tamanho dos MN pode ser um indicativo do modo de ação da substância-teste, pois, para substâncias clastogênicas, espera-se a formação de MN pequenos, de diâmetro 4 vezes inferior ao do núcleo da célula; enquanto substâncias aneugênicas levam à formação de MN maiores. Entretanto, a identificação da natureza dos MN (cromossomo ou fragmento cromossômico) para uma adequada determinação do seu mecanismo de indução – devido à atividade clastogênica e/ou aneugênica – deve ser conduzida por métodos mais efetivos como: marcação com anticorpos anti-cinetócoro, FISH com sondas de DNA pancentromérico ou marcação *in situ* com *primers* específicos para pancentrômero, juntamente com contracoloração de DNA apropriada.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Deve-se utilizar grupos de, no mínimo, 5 animais por sexo, com adição de controles positivos e negativos concorrentes em cada grupo.
- Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo concorrente.
- Controles positivos podem ser dispensados quando a proficiência do laboratório for demonstrada, com estabelecimento de uma faixa de controle histórico. Nesses casos, todavia, deve-se incluir em cada experimento controles de quantificação, por meio da inclusão de lâminas fixadas e não coradas ou amostras de células em suspensão. É aceitável que o controle positivo seja administrado em um esquema de tratamento e por uma via diferentes da substância teste.
- Controles negativos podem ter amostragem única, correspondente ao primeiro tempo de amostragem usado no estudo, caso sejam observadas no controle histórico frequências de células com micronúcleos e variabilidade interanimal consistentes. O número de micronúcleos do controle negativo concorrente deve estar dentro do controle histórico.
- Deve-se proceder com a seleção adequada do número de células analisadas e de doses testadas, com base nos critérios de dose máxima supracitados.
- Deve-se incluir no relatório de estudo evidências de que a substância alcançou o tecido-alvo, como alterações histopatológicas, alterações bioquímicas ou alterações na razão entre eritrócitos imaturos micronucleados e eritrócitos maduros micronucleados no grupo tratado (espera-se uma proporção no grupo controle de 1:1). Alternativamente, dados toxicocinéticos, obtidos em um estudo independente utilizando a mesma via de administração e a mesma espécie, podem ser utilizados para demonstrar a exposição da medula óssea.

Análise e interpretação dos resultados

Deve-se definir a proporção de eritrócitos imaturos para cada animal, por meio da contagem de, no mínimo, 500 eritrócitos na medula óssea e 2000 eritrócitos no sangue periférico. Um mínimo de 4000 eritrócitos imaturos por animal deve ser quantificado quanto à incidência de eritrócitos imaturos micronucleados (eritrócitos policromáticos). O número de eritrócitos imaturos, o número de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos devem ser informados separadamente para cada animal analisado. Para tratamentos contínuos de 4 semanas, o número e a proporção de eritrócitos maduros micronucleados (eritrócitos normocromáticos) também devem ser informados.

Com relação à interpretação dos resultados, uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se:

- Pelo menos um dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo na frequência de eritrócitos imaturos micronucleados em comparação ao controle negativo concorrente;
- O aumento for dose-dependente em, pelo menos, um tempo de amostragem, quando avaliado com um teste de tendência apropriado; e
- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhum dos grupos expostos apresenta um aumento estatisticamente significativo na frequência de eritrócitos imaturos micronucleados em comparação ao controle negativo concorrente;
- Não há aumento dose-dependente em qualquer tempo de amostragem, quando avaliado por um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estão dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*); e
- Há evidências de adequada exposição da medula óssea à substância teste.

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz a formação de micronúcleos nos eritrócitos imaturos da espécie animal investigada. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado (por exemplo,

um aumento fraco ou limítrofe), pode ser necessário analisar mais células ou repetir o experimento com condições experimentais modificadas. Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

b) Teste de Aberração Cromossômica na Medula Óssea de Mamíferos – Diretriz OECD 475

Considerações iniciais e limitações

Este ensaio identifica substâncias químicas capazes de induzir – em células da medula óssea de mamíferos – aberrações cromossômicas estruturais, as quais podem ser de dois tipos: nos cromossomos ou nas cromátides, a depender do mecanismo de ação. A ocorrência nas cromátides é mais frequente, enquanto nos cromossomos elas são observadas apenas na metáfase da primeira ou segunda divisão celular mitótica, pois as células que contêm aberrações geralmente são perdidas nas divisões celulares subsequentes.

O aumento de poliploidias *per se* (incluindo endoreduplicação) nesse ensaio não indica necessariamente um potencial aneugênico e pode ocorrer em decorrência da perturbação do ciclo celular ou da citotoxicidade. Logo, esse teste não é adequado para medir aneuploidias. Ainda, a análise é direcionada a células da medula óssea e, portanto, o ensaio não deve ser empregado caso não haja evidência de que a substância teste ou seu metabólito é capaz de alcançar esse tecido. Tal evidência deve estar descrita no relatório do estudo apresentado.

Princípio do teste

Este ensaio consiste na exposição de animais à substância teste por uma via de exposição apropriada, com posterior tratamento com Colcemid® ou colchicina – substâncias capazes de interromper o ciclo celular na fase de metáfase. Após determinado intervalo, os animais são eutanasiados, as células da medula óssea são coletadas e coradas e aquelas em metáfase são analisadas quanto a aberrações cromossômicas por microscopia.

Detalhamento do método

Esse ensaio deve ser conduzido preferencialmente em roedores, com a possibilidade de emprego de outros mamíferos, quando devidamente justificado. No relatório desse teste, deve-se incluir os ensaios de verificação da proficiência do laboratório, conforme disposto no item 9 da Diretriz OECD 475, ou dados do controle histórico – com inclusão de faixa e distribuição dos controles históricos positivo e negativo.

As doses utilizadas devem ser escolhidas com base em um estudo de seleção de doses – conduzido no mesmo laboratório, usando a mesma espécie, linhagem e

sexo, pela mesma via de exposição e regime de tratamento usados no estudo principal; ou nos resultados de estudos de toxicidade subaguda pré-existentes.

A fim de se obter informações sobre dose-resposta, o estudo completo deve incluir um grupo controle negativo e um mínimo de três níveis de dose, geralmente separados por um fator de 2, mas não superior a 4. Se for demonstrado no estudo preliminar de seleção de doses ou em dados toxicológicos pré-existentes que a substância teste não produz toxicidade, a maior dose para uma administração única deve ser de 2000 mg/kg peso corporal. Porém, se for verificada toxicidade, deve-se utilizar a DMT e doses inferiores até níveis que causem pouca ou nenhuma toxicidade.

Vale ressaltar que um estudo completo com três níveis de dose pode não ser necessário, caso seja verificado no momento da seleção das doses que um regime de tratamento na dose limite não produz efeitos tóxicos observáveis, incluindo nenhuma redução da proliferação da medula óssea ou outra evidência de citotoxicidade do tecido alvo; e que a genotoxicidade não é esperada com base em dados de estudos *in vitro* e de substâncias estruturalmente relacionadas. Essa dose limite é de 1000 mg/kg de peso corporal/dia, quando o tratamento é superior a 14 dias; e de 2000 mg/kg peso corporal/dia, para períodos de 14 dias ou menos.

Com relação ao esquema de tratamento, é feito por uma via representativa da exposição humana e, normalmente, em dose única, a qual pode ser dividida em duas ou mais administrações no mesmo dia, com intervalos de 2-3 horas no máximo. As amostras de medula óssea devem ser coletadas em dois momentos distintos: 12-18h após tratamento (tempo para completar 1,5 ciclo celular) e 24h após a primeira amostragem (nesse tempo, pode-se utilizar apenas a maior dose).

Na etapa de análise, deve-se determinar o índice mitótico como uma medida de citotoxicidade em, pelo menos, 1000 células/animal para todos os animais tratados e controle. Adicionalmente, aberrações cromossômicas estruturais devem ser analisadas em, no mínimo, 200 metáfases/animal; porém, se a resposta de fundo do controle negativo histórico for <1%, pode ser necessário avaliar mais células. Deve-se distinguir entre a ocorrência em cromossomos ou cromátides, com classificação por subtipos (intervalos, trocas) e as células analisadas devem ter número de centrômeros igual a $2n \pm 2$ (n é o número haplóide de cromossomos para essa espécie analisada).

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Utilização de grupos com, no mínimo, 5 animais por sexo e com adição de controles positivos e negativos concorrentes em cada um deles.
- Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo. Esses tipos de controles podem ser dispensados quando a proficiência do laboratório for demonstrada, com

estabelecimento de uma faixa de controle histórico. Nesses casos, todavia, deve-se incluir em cada experimento controles de quantificação, por meio da inclusão de lâminas fixadas e não coradas. É aceitável que o controle positivo seja administrado em um esquema de tratamento e por uma via diferentes da substância teste.

- Controles negativos devem estar dentro da faixa de controle histórico. Caso sejam observadas no controle histórico frequências de células com aberrações cromossômicas e variabilidade interanimal consistentes, uma única amostragem desse controle pode ser realizada, devendo esta corresponder ao primeiro tempo de amostragem usado no estudo.
- Análise de um número adequado de células, conforme especificado no item “Detalhamento do método”.
- Seleção adequada das doses testadas, com base nos critérios de dose máxima, conforme especificado no item “Detalhamento do método”.
- Deve-se incluir no relatório de estudo evidências de que a substância alcançou o tecido-alvo como alterações histopatológicas, alterações bioquímicas ou redução no índice mitótico. Alternativamente, dados toxicocinéticos, obtidos em um estudo independente utilizando a mesma via de administração e a mesma espécie, podem ser utilizados para demonstrar a exposição da medula óssea.

Análise e interpretação dos resultados

Os seguintes parâmetros devem ser informados por animal: índice mitótico, número de células em metáfase quantificadas, número de aberrações por célula em metáfase e a porcentagem de células contendo aberrações cromossômicas estruturais. Os diferentes tipos de aberrações estruturais devem ser listados, com seus números e frequências relativos aos grupos tratados e controle. Lacunas devem ser contabilizadas separadamente e em conjunto com as aberrações.

As frequências de poliploidia e endoreduplicação devem ser contabilizadas separadamente, pois podem indicar que a substância possui o potencial de inibir o processo mitótico ou a progressão do ciclo celular. Adicionalmente, dados sobre toxicidade animal e sinais clínicos devem ser relatados.

Com relação à interpretação dos resultados, uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se atender a todos os critérios detalhados abaixo:

- Pelo menos um dos grupos tratados apresentar um aumento estatisticamente significativo na frequência de aberrações cromossômicas estruturais (excluindo as lacunas) em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- O aumento for dose-dependente em, pelo menos, um tempo de amostragem, quando avaliado com um teste de tendência apropriado; e

- Qualquer um dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se, em todas as condições experimentais examinadas:

- Nenhum dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo na frequência de aberrações cromossômicas estruturais (excluindo as lacunas) em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- Não for observado aumento dose-dependente em nenhum tempo de amostragem, quando avaliado com um teste de tendência apropriado;
- Todos os resultados estiverem dentro da distribuição dos dados históricos de controle negativo (por exemplo, limites de controle de 95% baseados em *Poisson*); e
- Houver evidência de exposição da medula óssea à substância teste.

Resultados negativos indicam que, nas condições experimentais testadas, a substância teste não induz aberrações cromossômicas estruturais na medula óssea da espécie animal investigada. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento fraco ou limítrofe), pode ser necessário analisar mais células ou repetir o experimento com condições experimentais modificadas. Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

c) Teste de dominante letal em roedores – Diretriz 478

Considerações iniciais e limitações

Esse teste identifica substâncias químicas capazes de induzir mutação dominante letal (DL) em células germinativas de um progenitor exposto (geralmente camundongos ou ratos machos) ou no zigoto após a fertilização – o que resulta em morte embrionária ou fetal. Ou seja, uma mutação DL é geralmente causada por aberrações cromossômicas (estruturais ou numéricas), mas mutações gênicas e efeitos tóxicos não podem ser excluídos. Ela pode ocorrer em células germinativas *per se*, ou ser fixada no embrião após a fertilização.

Trata-se de um estudo útil na confirmação de resultados positivos obtidos em testes usando desfechos somáticos *in vivo*, bem como é um desfecho relevante para a

previsão de perigo humano e risco de transmissão de doenças genéticas pela linhagem germinativa. Entretanto, ele apresenta uma série de limitações, quais sejam: uso de grande número de animais, execução onerosa e demorada, e sensibilidade limitada para a detecção de pequenos aumentos na FM. Em razão disso, não deve ser empregado como método primário, mas sim de forma suplementar, em situações onde não há alternativas para atender requisitos regulatórios.

Princípio do teste

Esse ensaio consiste na exposição de animais machos à substância teste e posterior acasalamento deles com fêmeas não tratadas. Após um intervalo, as fêmeas são eutanasiadas e seus úteros são examinados para determinar o número de embriões implantados vivos e mortos. O cálculo do efeito letal dominante é baseado na comparação do número de embriões vivos implantados por fêmea do grupo tratado em relação ao do controle.

Detalhamento do método

Os esquemas de tratamento e de acasalamento devem ser embasados cientificamente. De modo geral, o número de intervalos de acasalamento após o tratamento é regido pelo próprio esquema de tratamento adotado e deve garantir que todas as fases de maturação das células germinativas masculinas sejam avaliadas quanto à indução de mutação DL.

Para um tratamento único com até cinco administrações diárias, deve haver 8 (em camundongos) ou 10 (em ratos) acasalamentos, em intervalos semanais após o último tratamento. Para administrações de doses múltiplas, o número de acasalamentos deve ser reduzido proporcionalmente ao aumento do período de administração (por exemplo, após um tratamento de 28 dias, apenas 4 acasalamentos semanais são suficientes para avaliar todas as fases da espermatogênese no camundongo). Assim, os regimes de exposição e de acasalamento utilizados dependem do objetivo final do estudo, isto é: 1) para determinar se a substância teste induz DL *per se*, o método aceito é a exposição durante um ciclo completo de espermatogênese (por exemplo, 7 semanas em camundongos, com 5-7 tratamentos por semana), com um acasalamento único ao término desse período; 2) para identificar o tipo de célula germinativa sensível à indução de mutação DL, é preferível realizar uma exposição única ou por cinco dias, seguida de acasalamento semanal.

As doses devem ser administradas por uma via representativa da exposição humana e devem ser escolhidas com base em um estudo de seleção de doses – conduzido no mesmo laboratório, usando a mesma espécie, linhagem e sexo, pela mesma via de exposição e regime de tratamento usados no estudo principal; ou nos resultados de estudos de toxicidade subaguda pré-existent.

A fim de se obter dados dose-resposta, o estudo completo deve incluir um grupo controle negativo e um mínimo de três níveis de dose, geralmente separados por um

fator de 2, mas não superior a 4. Se for demonstrado no estudo preliminar de seleção de doses ou em dados toxicológicos pré-existentes que a substância teste não produz toxicidade, a maior dose para uma administração única deve ser de 2000 mg/kg peso corporal. Para períodos inferiores a 14 dias, a dose deve ser de 2000 mg/kg peso corporal/dia; e para exposição igual ou superior a 14 dias, deve ser de 1000 mg/kg peso corporal/dia. Porém, se for verificada toxicidade, deve-se utilizar a DMT e doses inferiores até níveis que causem pouca ou nenhuma toxicidade.

Para a coleta de tecido a ser analisado, as fêmeas devem ser eutanasiadas no dia gestacional (DG) 13 para camundongos e DG 14-15 para ratos. Os úteros são examinados quanto a efeitos relativos à mutação DL para determinar o número de embriões implantados (vivos e mortos) e de corpos lúteos.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Inclusão, em cada grupo, de controles positivos e negativos concorrentes. Controles positivos concorrentes devem induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e devem produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo. É possível dispensá-los quando a proficiência do laboratório for demonstrada, com estabelecimento de uma faixa de controle histórico.
- Utilização de grupos de animais com um total de machos e fêmeas suficiente para fornecer o poder estatístico necessário para detectar, pelo menos, uma duplicação na frequência de DL (uma quantidade suficiente de fêmeas para ocorrência de 400 implantes) e, pelo menos, uma morte na implantação por unidade amostral (grupo de acasalamento por dose).
- Análise de um número adequado de embriões implantados e de doses.
- Seleção adequada das doses testadas, com base nos critérios de dose máxima supracitados.

A avaliação estatística deve considerar o animal macho como a unidade experimental. Embora seja possível que os dados contabilizados (por exemplo, número de implantações por fêmea) assumam uma distribuição de *Poisson* ou as proporções (por exemplo, proporção de embriões mortos pós-implantação) possam assumir distribuição binomial, geralmente os dados obtidos são superdispersos. Portanto, a análise estatística deve primeiramente empregar um teste de superdispersão usando testes de variância, como o teste de variação binomial de *Cochran* ou o teste de *Tarone* para superdispersão binomial. Se nenhum desvio da dispersão binomial for detectado, as proporções podem ser testadas para verificação de tendências entre as doses usando o teste de tendência de *Cochran-Armitage*; e, para as comparações pareadas, pode ser usado o teste exato de *Fisher*. Ainda, se não houver desvio da

dispersão de *Poisson*, tendências podem ser testadas usando a regressão de *Poisson* e comparações pareadas com o grupo controle podem ser testadas dentro do contexto do modelo de *Poisson*. Se for detectada superdispersão ou sub-dispersão significativa, são recomendados métodos não-paramétricos, como o teste de *Jonckheere-Terpstra* para os testes de tendência e de *Mann-Whitney* para comparações pareadas, bem como testes de permutação, reamostragem ou *bootstapping* para comparação pareadas ou de tendências.

Análise e interpretação dos resultados

As seguintes informações devem ser incluídas no relatório de estudo: dados de toxicidade e sinais clínicos; número de machos acasalados; número de fêmeas prenhes e não prenhes; resultados de cada acasalamento – com intervalo, nível de dose para machos tratados e números de embriões implantados vivos e mortos para cada fêmea.

O aumento no número de embriões mortos implantados reflete a perda pós-implantação, calculada pela razão de embriões mortos pelo total de implantações no grupo tratado comparada com a razão de embriões mortos pelo total de implantações no grupo controle. Já a perda pré-implantação é determinada pela diferença entre o número de corpos lúteos e o número de embriões implantados; ou pela redução no número médio de embriões implantados por fêmea em comparação ao controle. O fator de dominante letal é estimado por: [morte pós-implantação/total de implantações por fêmea] x 100.

Com relação à interpretação dos resultados, uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se todos os critérios abaixo forem atendidos:

- Pelo menos um dos grupos tratados apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- O aumento for dose-dependente em, pelo menos, uma condição experimental (por exemplo, um intervalo semanal de acasalamento), quando avaliado com um teste de tendência apropriado; e
- Qualquer um dos resultados estiver fora do intervalo aceitável de dados de controle negativo ou da distribuição dos dados de controle negativo histórico do laboratório (por exemplo, limite de controle de 95% baseado em *Poisson*), se disponível.

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se:

- Nenhum dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- Não for observado aumento dose-dependente em nenhuma condição experimental testada;

- Todos os resultados estiverem dentro do intervalo aceitável de dados de controle negativo ou da distribuição dos dados de controle negativo histórico do laboratório (por exemplo, limite de controle de 95% baseado em *Poisson*), se disponível.

Resultados negativos indicam que a substância teste não induz mutações dominante letais nas células germinativas da espécie animal investigada. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento fraco ou limítrofe), pode ser necessário proceder com investigações adicionais utilizando os dados experimentais existentes, tais como a consideração se o resultado positivo está fora do intervalo aceitável de dados de controle negativo, ou dos dados de controle negativo histórico do laboratório. Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

d) Teste de aberração cromossômica em espermatogônia de mamíferos – Diretriz OECD 483

Considerações iniciais e limitações

Esse ensaio identifica substâncias químicas que induzem aberrações cromossômicas estruturais (em cromossomos e cromátides) em células germinativas masculinas e é preditivo da indução de mutações hereditárias. As aberrações cromossômicas nas espermatogônias são facilmente observadas nas metáfases da primeira ou segunda divisão celular mitótica da espermatogênese. Para detectar aberrações em cromátides de espermatogônias, a primeira divisão celular mitótica após o tratamento deve ser avaliada, antes que elas sejam convertidas em aberrações do tipo cromossômico nas divisões celulares subsequentes. Informações adicionais de espermatócitos tratados podem ser obtidas por análise cromossômica meiótica para aberrações cromossômicas estruturais na diacinese-metáfase I e metáfase II.

Várias gerações de espermatogônias estão presentes nos testículos e esses diferentes tipos de células germinativas podem apresentar sensibilidade diferenciada ao tratamento químico. Assim, as aberrações detectadas representam uma resposta agregada das populações de células espermatogoniais tratadas. A maioria das células mitóticas nas preparações dos testículos são as espermatogônias B, que têm um ciclo celular de aproximadamente 26 horas.

Princípio do teste

Esse ensaio consiste na exposição de animais à substância teste por uma via de exposição apropriada, com posterior tratamento via intraperitoneal com Colcemid®

ou colchicina - substâncias capazes de interromper o ciclo celular na fase de metáfase. Após 3-5 horas (roedores), os animais são eutanasiados, as células germinativas são coletadas e coradas, e aquelas em metáfase são analisadas quanto a aberrações cromossômicas por microscopia.

Detalhamento do método

Esse ensaio deve ser conduzido preferencialmente em roedores, com a possibilidade de emprego de outros mamíferos, quando devidamente justificado. O tratamento deve ser feito em dose única e por uma via representativa da exposição humana. A adoção de esquemas diferentes desse deve ser justificada. Na dose mais alta, dois tempos de amostragem pós-tratamento devem ser usados (24 e 48h), pois o prolongamento da absorção e do metabolismo da substância, bem como o seu efeito na cinética do ciclo celular, podem afetar o tempo ótimo para a detecção de aberrações cromossômicas. Para as demais doses, deve ser utilizado o tempo de 24 horas (tempo do ciclo celular das espermatogônias B) para otimizar a probabilidade de classificar as primeiras metáfases após o tratamento. Outros tempos podem ser usados se houver interferência da substância no ciclo celular, desde que devidamente justificados.

As doses utilizadas devem ser escolhidas com base em um estudo preliminar de seleção de doses – conduzido no mesmo laboratório, com a mesma espécie, linhagem e sexo, pela mesma via de exposição e regime de tratamento usados no estudo principal. Tal estudo preliminar visa identificar a DMT, definida como a dose associada a efeitos tóxicos leves (comportamento anormal, redução leve no peso corporal, citotoxicidade hematopoiética), mas que não causa morte, dor, sofrimento ou estresse ao animal. A DMT também pode ser definida como uma dose que produz alguma indicação de toxicidade nas espermatogônias, por exemplo, redução (que não deve exceder 50%) na proporção de mitoses das primeira e segunda metáfases meióticas.

A fim de se obter dados dose-resposta, o estudo completo deve incluir um grupo controle negativo e um mínimo de três níveis de dose, geralmente separados por um fator de 2, mas não superior a 4. Se for demonstrado no estudo preliminar de seleção de doses ou em dados toxicológicos pré-existentes que a substância teste não produz toxicidade, a maior dose para uma administração única deve ser de 2000 mg/kg peso corporal. Porém, se for verificada toxicidade, deve-se utilizar a DMT e doses inferiores até níveis que causem pouca ou nenhuma toxicidade. Para administrações repetidas, deve-se utilizar a dose limite de 2000 mg/kg peso corporal (administração inferior a 14 dias) ou de 1000 mg/kg peso corporal (administrações por 14 dias ou mais).

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- No relatório do estudo, deve-se incluir evidências de que a substância teste

é capaz de alcançar os testículos.

- O controle negativo concorrente deve ser consistente com a faixa aceitável de dados de controle na literatura publicada (geralmente de 0 a 1,5% de células com aberrações cromossômicas) e com a distribuição de controle histórico do laboratório. Esse controle sempre deve ser incluído nas análises.
- O controle positivo concorrente deve induzir respostas compatíveis com o controle histórico positivo e deve produzir um aumento significativo quando comparado ao controle negativo. Esse controle positivo pode ser dispensado quando a proficiência do laboratório for demonstrada, com estabelecimento de uma faixa de controle histórico. Nesses casos, todavia, deve-se incluir em cada experimento os controles de quantificação, que são lâminas de referência obtidas em um estudo separado (controle positivo) e realizado periodicamente (por exemplo, a cada 6-18 meses).
- Deve-se utilizar, no mínimo, 5 animais por grupo.
- Deve-se analisar um número adequado de células e de doses, seguindo os critérios de dose máxima supracitados.

Análise e interpretação dos resultados

Na etapa de análise, no mínimo 200 metáfases devem ser contabilizadas por animal. Se a frequência do controle negativo histórico for menor do que 1%, deve-se contabilizar mais de 200 células/animal. Deve-se distinguir entre a ocorrência em cromossomos ou cromátides, com classificação por subtipos (intervalos, trocas) e as células analisadas devem ter número de centrômeros igual a $2n \pm 2$ (onde n é o número haplóide de cromossomos para essa espécie). Lacunas devem ser contabilizadas, mas não devem ser consideradas para a incidência de aberrações. Deve-se contabilizar a frequência de células poliploides e cromossomos duplicados, se encontrados. Se tanto a mitose quanto a meiose forem observadas, a proporção de mitoses para a primeira e a segunda metáfases meióticas devem ser determinadas como uma medida de citotoxicidade para os grupos tratados e controle negativo, em uma amostra total de 100 células em divisão por animal. Se apenas a mitose for observada, o índice mitótico deve ser determinado em, pelo menos, 1000 células para cada animal.

Uma substância teste pode ser considerada claramente positiva se:

- Pelo menos um dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- O aumento for dose-dependente em, pelo menos, um tempo de amostragem; e
- Qualquer um dos resultados estiver fora da faixa aceitável do controle negativo ou da distribuição do controle histórico negativo do laboratório (limite de 95% da distribuição de *Poisson*).

Por outro lado, desde que sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, uma substância teste é considerada claramente negativa se:

- Nenhum dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- Não for observado aumento dose-dependente em nenhuma condição experimental testada; e
- Todos os resultados estiverem dentro do intervalo aceitável de dados de controle negativo ou da distribuição dos dados de controle negativo histórico do laboratório (por exemplo, limite de controle de 95% baseado em *Poisson*), se disponível.

Resultados negativos indicam que a substância teste não induz aberrações cromossômicas em espermatogônias da espécie animal investigada. Contudo, um resultado negativo não exclui a possibilidade dessa substância teste poder induzir aberrações cromossômicas em fases posteriores do desenvolvimento não estudadas, ou mutações gênicas. Não há exigência de verificação de uma resposta claramente positiva ou claramente negativa.

Porém, nos casos em que a resposta não é claramente negativa ou positiva, e a fim de auxiliar na determinação da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento fraco ou limítrofe), pode ser necessário proceder com investigações adicionais utilizando os dados experimentais existentes, tais como a consideração se o resultado positivo está fora do intervalo aceitável de dados de controle negativo, ou dos dados de controle negativo histórico do laboratório. Se, mesmo após investigações mais aprofundadas, não for possível alcançar uma conclusão de que a substância teste leva a resultados positivos ou negativos, o resultado será considerado equívoco e, portanto, o estudo não será incluído na análise do WoE.

Um aumento no número de células poliploides pode indicar que o produto químico em estudo tem o potencial de inibir processos mitóticos e induzir aberrações cromossômicas numéricas. Um aumento no número de células com cromossomos endoreduplicados pode indicar o potencial de inibir o progresso do ciclo celular. Portanto, a incidência de células poliploides e de células com cromossomos endoreduplicados devem ser contabilizadas separadamente.

e) Ensaio de erro de translocação herdável em camundongos – Diretriz OECD 485

Considerações iniciais e limitações

Esse ensaio identifica substâncias químicas que induzem alterações cromossômicas estruturais e numéricas nas células germinativas da prole de primeira geração de machos expostos. É um teste que requer um grande número de animais e, portanto, é raramente usado. Além disso, sua execução requer um conhecimento específico, o qual não é facilmente disponível. O uso desse ensaio é desaconselhado

pela Anvisa em decorrência da grande quantidade de animais utilizada e da existência de outros ensaios que podem avaliar mutações em células germinativas. Entretanto, optou-se pela sua manutenção nesse Guia para orientar a avaliação de estudos já conduzidos. A própria OECD, em seu compilado de diretrizes recomendadas e atualizações referentes à toxicologia genética (OECD, 2016), ressalta que esse teste possui limitações e tem sido pouco utilizado. Entretanto, embora ele preencha os critérios para ser excluído do rol de ensaios recomendados, a OECD concluiu que ele ainda possui utilidade para certas agências reguladoras e, por isso, foi mantido.

Princípio do teste

Esse ensaio consiste na exposição de camundongos machos sexualmente maduros à substância teste, a qual induz translocação recíproca e perda de cromossomo X (progênie feminina). Essas condições estão associadas à fertilidade reduzida, a qual é usada para selecionar a progênie F1 para análise citogenética. A esterilidade completa é causada por certos tipos de translocações (X autossômica e do tipo c/t). As translocações são observadas citogeneticamente como configurações quadrivalentes – constituídas por dois conjuntos de cromossomos homólogos (bivalentes) – em espermátocitos primários em diacinese/metáfase I, tanto em machos da geração F1, quanto na prole masculina de fêmeas da geração F1.

Detalhamento do método

O número de animais a ser utilizado depende da frequência de translocação espontânea e da taxa mínima de indução necessária para um resultado positivo. Assim, faz-se necessária a utilização de um total de 500 machos da geração F1 por dose. O regime de tratamento pode ser efetuado em dose única (mais comum) ou repetida (7 dias/semana por 35 dias). Com relação ao esquema de doses, deve-se adotar a DMT – dose associada à produção de efeitos tóxicos mínimos, mas sem afetar o comportamento reprodutivo ou a sobrevivência. Para o estabelecimento de uma relação dose-resposta, são necessárias duas doses adicionais, inferiores à DMT. Em casos de substâncias não tóxicas, a dose selecionada deve ser de até 5g/kg peso corporal (dose única) ou até 1g/kg peso corporal/dia (dose repetida). Se essas dosagens não forem praticáveis, deve-se adotar a dose mais alta possível. A administração deve ser conduzida por uma via relevante para a exposição humana. O número de acasalamentos após o tratamento é determinado pelo regime de doses adotado e deve garantir que todos os estágios das células germinativas tratadas sejam amostrados.

Para analisar a heterozigiosidade da translocação, pode-se utilizar um dos dois métodos possíveis: 1) teste de fertilidade da progênie F1, com posterior verificação de possíveis portadores de translocação por análise citogenética; ou 2) análise citogenética de toda a progênie masculina F1, sem prévia seleção pelo teste de fertilidade. A redução da fertilidade pode ser determinada pela observação do tamanho da ninhada e/ou pela

análise do conteúdo uterino das fêmeas parceiras no acasalamento, no qual o número de implantes mortos é indicativo da presença de uma translocação no macho testado. As fêmeas portadoras de translocação são identificadas por análise citogenética de qualquer um de seus descendentes machos. A análise de metáfases mitóticas, espermatogônias ou medula óssea é necessária em machos F1 com testículos pequenos e rompimento da carioteca antes da diacinese ou em fêmeas F1 suspeitas de XO.

Critérios de aceitabilidade

Os seguintes critérios devem ser seguidos para que o estudo seja considerado aceitável:

- Inclusão de controles positivo e negativo concorrentes. Esse controle positivo pode ser dispensado quando houver a disponibilidade de resultados aceitáveis provenientes de estudos de controle positivo recentes.
- Utilização de um total de 500 machos da geração F1 por dose.
- Análise microscópica de, no mínimo, 25 células em diacinese-metáfase I por macho.

Análise e interpretação dos resultados

Para a avaliação da fertilidade de animais F1, deve-se apresentar o tamanho médio da ninhada de todos os acasalamentos normais e os tamanhos das ninhadas individuais dos animais F1 portadores de translocação. Para análise do conteúdo uterino, deve-se apresentar o número médio de embriões implantados vivos e mortos em acasalamentos normais e o número individual dessas implantações para cada acasalamento de animais F1 portadores de translocação. Para a análise citogenética da diacinese-metáfase I, deve-se apresentar o número e os tipos de configurações multivalentes, bem como o número total de células para cada portador de translocação. Para indivíduos F1 estéreis, deve-se apresentar o número total de acasalamentos e a duração do período de acasalamento, bem como o peso dos testículos e os detalhes da análise citogenética. Para as fêmeas XO, deve-se apresentar o tamanho médio da ninhada, a proporção de sexo na progênie F2 e a análise citogenética.

As fêmeas XO são identificadas pela mudança na proporção de sexo masculino/feminino na prole de 1:1 para 1:2. Na análise citogenética, a observação de pelo menos 2 células com configuração multivalente constitui evidência necessária de que o macho testado é um portador de translocação. A presença de um cromossomo incomumente longo e/ou curto em 1 a cada 10 células é evidência da ocorrência de uma translocação estéril masculina específica (tipo c/t). A presença de 39 cromossomos em 10 mitoses constitui evidência de uma condição XO em fêmeas.

Uma substância teste pode ser considerada positiva se:

- Pelo menos um dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo no número de translocações em comparação

ao grupo controle negativo concorrente;

- Aumento estatisticamente significativo dose-dependente no número de translocações.

Uma substância teste pode ser considerada negativa se:

- Nenhum dos grupos expostos apresentar um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle negativo concorrente;
- Não for observado aumento dose-dependente nas condições experimentais testadas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação do potencial de mutagenicidade associado aos IA de agrotóxicos é conduzida pela Anvisa com a utilização da abordagem de WoE, efetuada com base em critérios também seguidos por outras autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão.

Essa avaliação segue uma estratégia faseada e integrada de testes para a identificação do perigo, de modo a possibilitar a obtenção de dados suficientes para uma adequada caracterização do perigo. Tal estratégia ajuda a minimizar a utilização de animais e os custos sempre que compatível com o rigor científico. Com relação à abordagem de WoE, são considerados a qualidade, a magnitude da resposta, a dose-resposta, a relevância, a reprodutibilidade e a consistência dos achados provenientes dos estudos disponíveis. Ainda, é atribuído maior peso aos estudos de mutação gênica e danos cromossômicos, em comparação aos estudos de dano primário ao DNA; maior peso aos estudos *in vivo* do que aos estudos *in vitro*; e, por fim, maior peso aos resultados obtidos pela via oral. Também é importante ressaltar que a consistência e reprodutibilidade dos dados serão consideradas na abordagem de WoE, especialmente na existência de resultados contraditórios entre estudos considerados de qualidade.

Especificamente quanto ao procedimento adotado pela Anvisa para a avaliação da mutagenicidade na reavaliação, inicialmente serão consideradas as conclusões das análises efetuadas pela USEPA e EFSA, quando disponíveis, bem como de outras autoridades regulatórias internacionais. Nesse primeiro momento, além da qualidade e da força das evidências fornecidas por cada estudo individualmente, é considerada também a adequabilidade dessas avaliações internacionais ao contexto regulatório no Brasil. Assim, em caso de alinhamento entre as discussões internacionais e de concordância com a abordagem do WoE conduzida pela Anvisa, as conclusões dessa agência serão alcançadas com base nas discussões internacionais. Por outro lado, em caso de discordâncias relevantes entre as autoridades internacionais; superficialidade da análise ou discrepâncias no modo de avaliação da qualidade dos estudos; diferenças significativas na quantidade de estudos incluídos nas análises e existência de novas evidências; a Anvisa realizará uma análise completa e aprofundada de todos os estudos relevantes disponíveis – tanto aqueles regulatórios quanto os disponíveis na literatura

– para se alcançar uma conclusão quanto ao WoE.

A avaliação dose-resposta para mutagenicidade é realizada conforme diretrizes específicas previstas no Guia que trata da derivação de doses de referência. Os modelos de tabelas para compilação dos dados e de relatórios a serem elaborados pelas empresas registrantes para IA em reavaliação são disponibilizados no portal eletrônico da Anvisa.

No presente guia, a fim de conferir transparência e previsibilidade ao processo regulatório, foram abordados os principais ensaios *in vitro* e *in vivo*, para investigação dos desfechos de mutação gênica e danos cromossômicos, considerados relevantes pela OECD para a caracterização da mutagenicidade de agrotóxicos. Buscou-se incluir as informações básicas para a condução de cada um deles, bem como as recomendações para as avaliações dos resultados obtidos. Para a execução desses ensaios e interpretação dos dados, recomenda-se consultar diretamente as respectivas Diretrizes da OECD.

É importante ressaltar que o conhecimento relativo à avaliação toxicológica está em constante avanço. Desse modo, ensaios ou abordagens de avaliação alternativos – métodos *in silico* e *in vitro* – quando considerados suficientemente robustos e reconhecidos internacionalmente no contexto regulatório, também podem fazer parte da investigação do potencial mutagênico, reduzindo a necessidade de testes em animais ou humanos. Isto é, trata-se de ferramentas importantes para análise e, dependendo do contexto, podem eventualmente ser capazes de atender aos requisitos regulatórios para avaliação da mutagenicidade.

Alguns novos métodos de testes *in vitro* foram incluídos no programa de trabalho da OECD com o objetivo de desenvolver potenciais diretrizes regulatórias. Dentre eles, pode-se citar o *Toxtracker*, que usa células-tronco e mede a expressão de genes repórteres envolvidos em algumas vias genotóxicas e não genotóxicas relacionados à carcinogenicidade. Adicionalmente, há o ensaio γ H2AX/fosfo-histona H3, baseado nos estados de fosforilação de histonas específicas (H2A e H3) usadas como biomarcadores precoces de resposta celular a danos ao DNA. Esse teste potencialmente é capaz de fornecer informações sobre diferentes modos de ação de mutagenicidade, incluindo uma discriminação entre efeitos clastogênicos e aneugênicos (ECHA, 2023).

Caso seja necessário o emprego de testes *in vivo*, recomenda-se uma abordagem flexível, buscando minimizar o número de animais utilizados sempre que possível. Isso pode ser alcançado, por exemplo, por meio da combinação de avaliações teciduais e diferentes estudos toxicológicos (exposição aguda e repetida), quando cientificamente justificado (ECHA, 2023). Nesse contexto, tecnologias atuais de alto rendimento, como citometria de fluxo e microscopia automatizada, permitem detecções e quantificações mais rápidas e precisas *in vivo*, podendo ser prontamente integradas em vários ensaios de dose repetida, reduzindo a necessidade de ensaios específicos

de mutagenicidade (FAO/WHO, 2020). Ainda, novos ensaios *in vivo* permitem a avaliação de MN em fígado e intestino, com mensuração da recombinação homóloga em praticamente qualquer órgão de interesse. O documento *Principles and methods for the risk assessment of chemical in food*, na sessão 4.5 *Genotoxicity* (FAO/WHO, 2020), elenca vários desses novos ensaios, com detalhamento dos seus princípios, vantagens e limitações.

Esses e outros estudos que visem esclarecer o potencial mutagênico de uma substância, mas que não foram descritos neste Guia, podem ser incluídos na avaliação do WoE quando considerados relevantes para a tomada de decisão. Nesse caso, eles serão avaliados quanto às suas limitações, aceitabilidade e resultados, com base nos mesmos fundamentos científicos que permeiam a análise dos demais estudos deste Guia.

9. LISTA DE ABREVIATURAS

AOP: *Adverse Outcome Pathway* (Via de efeito adverso)
AR: Avaliação de Risco
CitoB: Citocalasina B
CHO: *Chinese Hamster Ovary* (ovário de hamster chinês)
CHL: *Chinese Hamster Lung* (pulmão de hamster chinês)
CTR: Crescimento Total Relativo
CRS: Crescimento Relativo na Suspensão
DG: Dia Gestacional
DL: Dominante Letal
DMT: Dose Máxima Tolerada
ECHA: *European Chemical Agency* (Agência Europeia de Produtos Químicos)
EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)
ERC: Eficiência Relativa de Clonagem
EC: Eficiência de Clonagem
FISH: *Fluorescence in Situ Hybridization* (hibridação fluorescente *in situ*)
FM: Frequência de Mutação
GEF: *Global Evaluation Factor* (Fator Global de Avaliação)
GHS: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)
GPI: Glicosilfosfatidilinositol
Gpt: *Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase transgene* (transgene xantina-guanina fosforibosil transferase)
IA: Ingrediente Ativo
i.p.: Intraperitoneal
IPBC: Índice de Proliferação de Bloqueio de Citocinese
IR: Índice de Replicação
HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
MI: *Mitotic Index* (índice mitótico)
MLA: *Mouse Lymphoma Assay* (ensaio de linfoma de camundongo)
MN: Micronúcleo
MoA: *Mode of Action* (modo de ação)
MUT RET: Reticulócitos mutantes

MUT RBC: Eritrócitos mutantes

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

Pig-a: *Phosphatidylinositol glycan class A* (fosfatidilinositol glicano classe A)

(Q)SAR: *Quantitative Structure–Activity Relationship Model* (Modelo da Relação Quantitativa Estrutura-Atividade)

RM: Razão de Mutagenicidade

RPD: *Relative Population Doubling* (Duplicação relativa da população)

RICC: *Relative Increase in Cell Count* (Aumento relativo na contagem de células)

SRel: Sobrevivência Relativa

TG: 6-Tioguanina

TFT: Trifluorotimidina

TK: Timidina quinase

ufc: Unidades formadoras de colônias

ufp: Unidades formadoras de placas

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

XPRT: Xantina-guanina fosforibosil transferase

WoE: *Weight of Evidence* (peso da evidência)

10. REFERÊNCIAS

BRASIL. Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins; revoga as Leis nºs 7.802, de 11 de julho de 1989, e 9.974, de 6 de junho de 2000, e partes de anexos das Leis nºs 6.938, de 31 de agosto de 1981, e 9.782, de 26 de janeiro de 1999. D.O.U página: 28 de 28/12/2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. D.O.U. - Edição: 146, Seção: 1, Página: 78 de 31/07/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 296, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre as informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira. D.O.U. - Edição: 146, Seção: 1, Página: 86 de 31/07/2019.

COTICCHIO G., DAL CANTO M.B., RENZINI M.M., GUGLIELMO M.C., BRAMBILLASCA F., TURCHI D., NOVARA P.V., FADINI R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproductive Update*, V. o, N. 0, p. 1-28. **2015**.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I. and VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*. **2002**; 521: 121-135.

ECHA. European Chemicals Agency. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance. Version 6.0. ECHA-17-G-18-EN. July, **2017**.

ECHA. European Chemicals Agency. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance. Draft Version 7.0. **2023**.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of the Margin of Exposure for substances that are both genotoxic and carcinogenic. EFSA Journal, 282, 1-31. **2005**.

EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. EFSA Journal. V. 9, n. 9, p. 2379. [69 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2379. **2011**.

EFSA. European Food Safety Authority, Scientific Opinion. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. EFSA Journal 10(3):2579. **2012**.

EFSA. European Food Safety Authority. PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues). Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment. EFSA Journal; 14(12):4549, 129 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4549. **2016**.

EFSA. European Food Safety Authority. Guidance on the use of the weight of evidence approach in scientific assessments. EFSA-Q-2015-00007. **2017**.

EFSA. European Food Safety Authority. Guidance on aneugenicity assessment. Scientific opinion. EFSA Journal, v. 19, n. 8, p. 6770. **2021**.

EFSA. European Food Safety Authority. Margem de exposição. Atualizado em 27 de abril de 2023. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/margin-exposure>. **2023**.

European Parliament. Regulation (EC) No 283/2013. EUR-Lex - 02013R0283-20221121 - EN - EUR-Lex (n.d.). Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02013R0283-20221121>. **2013**.

European Parliament. Regulation (EC) No 440/2008. EUR-Lex - 02008R0440-20230326 - EN - EUR-Lex. (n.d.). Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02008R0440-20230326>. **2008**.

FAO/WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemical in food. Environmental Health Criteria 240. Section 4.5 Genotoxicity. Second Edition. **2020**.

HARDY, A., BENFORD, D., HALLDORSSON, et al. Clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. EFSA J.;15(12). doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.5113. **2017**.

IPCS. WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Environmental health criteria 240. Chapter 5 Dose–response assessment and derivation of health-based guidance values. Second edition. **2020**. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/food-safety/publications/chapter5-dose-response.pdf?sfvrsn=32edc2c6_5

KIRSCH-VOLDERS M., VANHAUWAERTA A., EICHENLAUB-RITTER U., DECORDIER I. Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicology Letters, v. 140-141, p. 63-74. **2003**.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 478: Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071360-en>. **1984**.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 485: Genetic toxicology, Mouse Heritable Translocation Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071506-en>. **1986.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071322-en>. **1997.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071308-en>. **1997.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264091016-en>. **2010.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance on grouping of chemicals, second edition. Series on Testing & Assessment No. 194. ENV/JM/MONO(2014)4. Abril, **2014.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224292-en>. **2014.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Series on Testing & Assessment No. 238 - 2nd edition. 22-Aug-20. Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology. ENV/JM/MONO (2016)33. **2016.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264908-en>. **2016.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264649-en>. **2016.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 483: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264847-en>. **2016.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>. **2020.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test n° 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203907-en>. **2022.**

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. (Q)SAR Assessment

Framework: Guidance for the regulatory assessment of (Quantitative) Structure – Activity Relationship models, predictions, and results based on multiple predictions. Series on Testing and Assessment No. 386. ENV/CBC/MONO(2023)32. **2023**.

STENSON, P.D. et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. Hum Genet, v 139, n. 10, p 1197-1207. **2020**.

THYBAUD, V.; et al. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. Mutation Research, **2019**.

PHILLIPS, D.H. and BENTHEM, J.V. Strategies in case of positive in vivo results in genotoxicity testing strategies in vivo. Mutation Research. **2011**; 723:121-128.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Guidelines for Mutagenicity Risk Assessment. EPA/630/R-98/003, Federal Register 51(185):34006-34012, **1986**.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001F, Risk Assessment Forum, Washington, DC, **2005**.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, “40 CFR Part 180, [EPA–HQ–OPP–2008–0877; FRL– 9344–1]. 2,4-D; Order Denying NRDC’s Petition To Revoke Tolerances,” Order. Federal Register vol. 77, no. 75, pp. 23135-23158, **2012**.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Guiding principles for data requirements. Office of Pesticide Programs. Washington DC, 20460. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-01/documents/data-require-guide-principle.pdf>. **2013**.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Reference Dose (RfD): Description and Use in Health Risk Assessments. Background Document 1A, 1993. Atualizado em Junho **2023**. Disponível em: <https://www.epa.gov/iris/reference-dose-rfd-description-and-use-health-risk-assessments#1.1.1>

VOGT E., KIRSCH-VOLDERS M., PARRY J., EICHENLAUB-RITTER U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. Mutation Research, v. 651, p.14-29. **2008**.

WHITE, Paul A.; LONG, Alexandra S.; JOHNSON, George E. Quantitative interpretation of genetic toxicity dose-response data for risk assessment and regulatory decision-making: current status and emerging priorities. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 61, n. 1, p. 66-83, **2020**.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
SIA Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200
CEP: 71205-050
Brasília – DF

www.anvisa.gov.br

www.twitter.com/anvisa_oficial

Anvisa Atende: 0800-642-9782

ouvidoria@anvisa.gov.br