

1) É possível segundo apresentado o estabelecimento de limiar de dose para produtos mutagênicos em células somáticas e/ou germinativas? Se esse é o caso, como estabelecer limiar a partir de estudos *in vitro*?

Conforme entendimento atualmente disposto na versão 1 do Guia de mutagenicidade (item 5.1), é possível estabelecer um limiar de dose somente para os casos de aneugenicidade, posto que substâncias aneugênicas induzem aberrações cromossômicas numéricas por meio de interações com outros alvos celulares (centrômeros, telômeros, cinetócoros, tubulinas, dentre outros), sem afetar diretamente o DNA. Essa diferença no sítio-alvo confere à aneugenicidade características próprias, distintas das mutações pontuais e da clastogenicidade, quais sejam: a) um número crítico de sítios-alvos deve ser afetado para a ocorrência do efeito; b) a curva dose-resposta geralmente apresenta alta inclinação dentro de um intervalo de concentração/dose pequeno; c) a dose-resposta é não linear, ou seja, efeitos aneugênicos não são observados abaixo de um determinado limiar de dose. Para a determinação de um limiar para aneugenicidade, é necessário que o composto em análise disponha de grande riqueza de dados, com adequada caracterização da dose-resposta *in vivo* em células germinativas, como também dados mecanísticos (modo/mecanismo de ação, via do efeito adverso) capazes de corroborar que o nível de dose definido como limiar é suficientemente protetivo para evitar ocorrência *in vivo* do evento molecular iniciador e dos eventos-chave posteriores. Por essa razão, no entendimento atual, não é possível estabelecer um limiar com base em dados *in vitro*. O limiar precisa ser bem caracterizado e estar fortemente embasado em dados experimentais para garantir a proteção da saúde da população. Como ainda não há padronização internacionalmente aceita para derivação de doses *in vivo* a partir de estudos *in vitro* para este desfecho, a Anvisa ainda não adota essa abordagem.

2) Muitos testes do micronúcleo são realizados em células de linhagens tumorais humanas. Esses estudos *in vitro* em células tumorais podem ser considerados?

Sim, todos os estudos apresentados serão avaliados conforme a abordagem de peso da evidência, detalhada no item 5 do Guia de mutagenicidade. Primeiramente, será avaliada a relevância e confiabilidade do estudo, para que ele seja incluído na linha de evidência apropriada. Posteriormente, será avaliada a força das evidências fornecidas por esse estudo para que, por fim, elas sejam integradas às demais evidências disponíveis para se alcançar uma conclusão.

3) Uma vez que o IA possua avaliação por agências europeias a avaliação dos estudos de genotoxicidade e mutagenicidade neste caso não seriam necessários? Uma vez que os critérios das agências europeias equivalem aos critérios da ANVISA?

No item 6 do Guia de mutagenicidade, consta o detalhamento do racional adotado pela Anvisa quanto ao uso de avaliações toxicológicas de autoridades regulatórias internacionais para se alcançar uma conclusão sobre o potencial mutagênico de determinado composto. Desse modo, a disponibilidade de uma avaliação toxicológica feita previamente por agências europeias não significa que as conclusões dessa análise serão automaticamente adotadas pela Anvisa, sem que sejam considerados os relatórios das demais agências, bem como as análises dos estudos de mutagenicidade e genotoxicidade efetuadas diretamente pela Anvisa. Isso porque, ainda que o entendimento na Europa seja alinhado ao da Anvisa quanto ao desfecho de mutagenicidade – no que se refere à classificação do perigo com base no GHS e à proibição de registro de compostos mutagênicos – outros fatores também são considerados pela Anvisa para se optar pela conclusão da análise desse desfecho toxicológico somente com base nas discussões internacionais. São eles: suficiente harmonia entre as discussões internacionais, concordância com a avaliação do peso da evidência realizada no Brasil e adequabilidade das conclusões à

legislação brasileira. Por outro lado, 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, a Anvisa opta por realizar uma análise mais aprofundada dos estudos considerados mais relevantes para se alcançar uma conclusão, com base na abordagem de peso da evidência.

4) Como a Agência trata o caso de metabolitos determinados mutagênicos em células somáticas?

Nesses casos, a discussão deve ser aprofundada em termos de toxicocinética, posto que é necessário esclarecer a extensão de formação *in vivo* desses metabólitos mutagênicos, bem como sua distribuição e excreção. Ou seja, é muito relevante discutir, por exemplo, os parâmetros toxicocinéticos (AUC, $T_{máx}$, $C_{máx}$) do composto parental e dos metabólitos, tanto no plasma quanto nas células germinativas, para se verificar o nível/tempo de exposição aos compostos mutagênicos, bem como para aprofundar a discussão da extrapolação para humanos desses dados obtidos em animais experimentais.

5) Como a Agência trata o caso de impurezas mutagênicas em células somáticas?

A Instrução Normativa Conjunta (INC) nº 02, de 20 de junho de 2008, em seu inciso I, Parágrafo único, Art. 1, define como impureza relevante: “I - qualquer impureza identificada em bancos de dados toxicológicos que exibam efeitos teratogênicos, carcinogênicos, mutagênicos ou de alterações hormonais e danos ao aparelho reprodutor;”. Desse modo, quando se identifica um potencial mutagênico para determinada impureza, a sua concentração no produto é comparada ao valor limite para a classificação de misturas: $\geq 0,3\%$ para toxicidade reprodutiva, previsto na tabela 3.7.1 do item 3.7.3.3 do Capítulo 3.6 do GHS e $\geq 0,1\%$ para carcinogênese, como previsto na tabela 3.6.1 no item 3.6.3.3 do Capítulo 3.6 do GHS, os quais são usados em analogia pela Anvisa como auxílio na definição de impurezas toxicologicamente relevantes. Isto é, caso essa impureza ocorra em concentração superior a esse valor limite, ela será considerada uma impureza toxicologicamente relevante e será definido o limite máximo para a sua ocorrência nos produtos registrados.

6) Os estudos que são levados em consideração, são de exposições agudas e crônicas?

O detalhamento do protocolo dos estudos destinados à avaliação da mutagenicidade pela Anvisa consta no item 7 do Guia de mutagenicidade, sendo o regime de exposição lá descrito para cada um desses estudos correspondente ao previsto nas diretrizes regulatórias da OECD vigentes.

7) A ANVISA pretende aceitar ou já aceita alguma abordagem para desfechos positivos de mutagênese sem limiar (clastogênico, e.g.)? Por exemplo, considerando o conceito de Acceptable intake (AI), utilizado em outros setores regulatórios, seria possível uma extrapolação linear da dose tumorigênica de 50% (TD50) para uma dose segura?

No entendimento atual da avaliação toxicológica de agrotóxicos, considerando o arcabouço legal que ampara essa análise – qual seja: a proibição de compostos mutagênicos para os quais não seja possível a determinação de limiar de dose – para os desfechos mutagênicos de clastogenicidade e mutação gênica, não se considera possível a determinação de limiar, uma vez que se presume a ocorrência de linearidade em baixas doses.

8) A mesma explicação de possibilidade de estabelecer limiar para aneugenicidade não poderia ser atribuídos para substâncias mutagênicas que não interagem diretamente com DNA e interagem por via indireta, como mutagenicidade por aumento de estresse oxidativo, inibição enzimático/proteassoma, etc..?

O Guia de Aneugenicidade publicado pela EFSA (2021), utilizado como embasamento para a discussão de determinação de limiar de dose para aneugenicidade (item 5.1 do Guia de mutagenicidade) pela Anvisa, esclarece que esse desfecho apresenta características próprias, distintas da mutação gênica e da clastogenicidade, pois decorre da interferência com alvos celulares/moleculares, sem que o DNA seja diretamente afetado. Essas características são: a) um número crítico de sítios-alvos deve ser afetado para a ocorrência do efeito; b) a curva dose-resposta geralmente apresenta alta inclinação dentro de um intervalo de concentração/dose pequeno; c) a dose-resposta é não linear, ou seja, efeitos aneugênicos não são observados abaixo de um determinado limiar de dose. Desse modo, em analogia, seria possível determinar limiar de dose para os casos de mutagenicidade que se adequassem a esse racional, isto é, que também apresentassem essas características supracitadas. Contudo, atualmente não há uma abordagem regulatória internacionalmente reconhecida e cientificamente embasada que possibilite empregar esse mesmo racional para mutágenos indiretos. Vale ressaltar que, até mesmo para os desfechos aneugênicos a determinação de limiar ocorrerá exclusivamente para casos específicos em que se tenha grande riqueza de dados (toxicológicos e mecanísticos) para garantir uma adequada caracterização da dose-resposta do composto mutagênico e aumentar a confiabilidade de que a dose selecionada pode ser considerada um limiar seguro para a ocorrência desse desfecho.

9) Consideradas todas as limitações apresentadas para estabelecimento de limiar de dose para produtos aneugênicos, quais estudos a ANVISA considera adequados para estabelecimento de limiar de dose?

O item 5.1 do Guia de mutagenicidade discute o racional seguido pela Anvisa para a determinação de um limiar de dose para o desfecho de aneugenicidade. O entendimento atual é de isso seria possível para compostos com grande riqueza de dados, com adequada caracterização da dose-resposta *in vivo* em células germinativas, como também dados mecanísticos (Modo/ mecanismo de ação, via do efeito adverso) capazes de corroborar que o nível de dose definido como limiar pode ser considerado suficientemente protetivo para evitar ocorrência do evento molecular iniciador e dos eventos-chave posteriores. Desse modo, na prática, seria necessária a identificação de um valor de NOAEL em um estudo experimental com elevado grau de confiabilidade (força da evidência), o qual pudesse ser considerado como ponto de partida; em associação a informações adicionais de mecanismo, de toxicocinética, de subpopulações potencialmente mais sensíveis, e outras consideradas relevantes para a definição adequada dos fatores de incerteza a serem aplicados para a definição das doses de referência.

10) Durante a análise de peso de evidência estudos realizados de acordo com os princípios de BPL tem um peso diferenciado frente a estudos não BPL?

A adequação às BPL é um dos fatores considerados na análise do peso da evidência, sendo esta verificada por meio de uma série de parâmetros avaliados nos estudos experimentais (qualidade dos controles histórico/concorrente; descrição detalhada da metodologia e dos resultados; análise estatística adequada; adequação do protocolo de estudo às diretrizes regulatórias, ou compatibilidade com o que se pretende investigar, caso não se tenha diretriz correspondente). Todos esses fatores são considerados conjuntamente para se verificar o atendimento de determinado estudo aos princípios de confiabilidade, relevância e consistência, os quais embasam o processo estruturado de análise do peso da evidência, conforme detalhado no item 5 do Guia de mutagenicidade.

11) Como a agência aborda a possibilidade de compostos que possam ser mutagênicos exclusivos para células germinativas?

Segundo o GHS, todos os compostos conhecidos como mutagênicos em células germinativas também são mutagênicos em células somáticas. Assim, aqueles que demonstrarem mutagenicidade em células somáticas podem induzir efeitos adversos hereditários caso eles, ou os seus metabolitos ativos, possuam capacidade de interagir com o material genético das células germinativas. Então, não se espera que substâncias que não induzam mutações em células somáticas *in vivo* sejam mutagênicas em células germinativas.