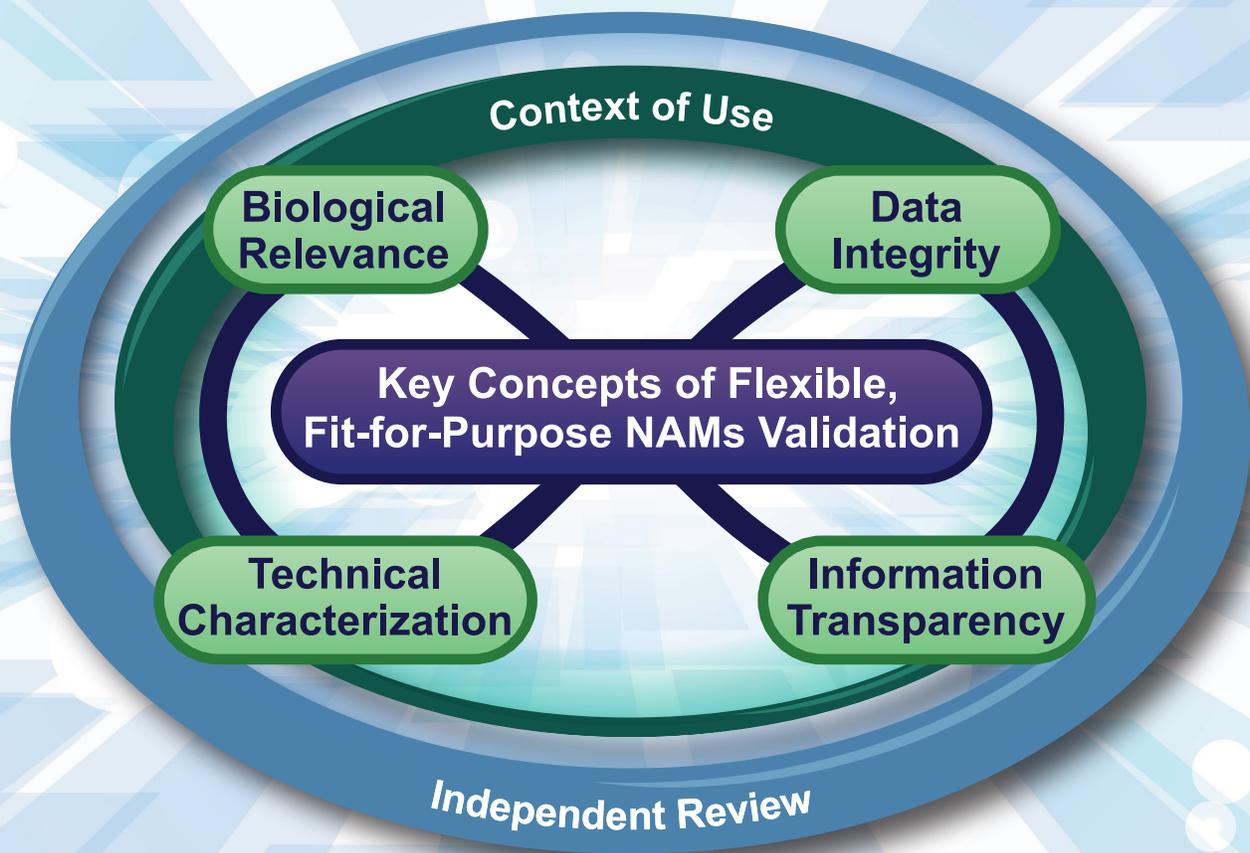


# Validação, qualificação e aceitação regulatória de novas metodologias de abordagem

Março de 2024



## Sumário

Lista de tabelas.....	v
Lista de figuras.....	vi
Siglas e abreviaturas .....	vii
Grupo de trabalho de validação do ICCVAM .....	ix
Representantes da Agência ICCVAM .....	xi
Isenção de responsabilidade.....	1
Resumo geral .....	1
1.0 Introdução .....	2
2.0 Conceitos-chave em validação de NAMs adequadas à finalidade e flexíveis .....	4
3.0 Aplicação dos conceitos-chave para gerar confiança nas NAMs .....	6
3.1 Contexto de uso.....	6
3.2 Relevância biológica .....	8
3.2.1 Compreensão mecanicista.....	8
3.2.2 Compostos de referência.....	11
3.2.3 Comparação com os métodos existentes em animais de laboratório .....	14
3.3 Caracterização técnica.....	16
3.3.1 Incorporação de ferramentas de qualidade selecionadas .....	17
3.3.2 Melhores práticas para controle de qualidade.....	19
3.3.3 Documentação.....	25
3.4 Integridade dos dados.....	28
3.5 Transparência das informações .....	29
3.6 Revisão independente.....	29
4.0 Aceitação de NAMs pela Agência Federal dos EUA .....	30

4.1	Compreensão das necessidades regulatórias e contextos de decisão .....	30
4.2	Considerações sobre o contexto de uso.....	31
4.3	Evolução da confiança com base na experiência adquirida .....	31
5.0	Harmonização internacional e dos EUA.....	32
5.1	Harmonização dos EUA: papel do ICCVAM e do NICEATM.....	32
5.2	Harmonização dos EUA: colaborações federais adicionais para promover os 3Rs.....	33
5.3	Harmonização internacional.....	34
6.0	Comunicação e treinamento para incentivar o uso de NAMs.....	35
7.0	Conclusão e implementação .....	36
	Referências.....	37
	APÊNDICE A: GLOSSÁRIO .....	48
	APÊNDICE B: FERRAMENTAS DE QUALIDADE.....	54
1.0	Fluxogramas .....	54
2.0	Análise de causa e efeito .....	55
3.0	Gráficos de controle .....	56
4.0	Fichas de verificação .....	58
5.0	Gráficos de dispersão .....	58
	APÊNDICE C: AVALIAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	60
1.0	Limites de detecção e quantificação.....	60
2.0	Identificação de interferência.....	60
3.0	Avaliação da precisão analítica .....	60
4.0	Estabilidade dos materiais.....	60
5.0	Ensaio de robustez.....	61
6.0	Análise de recuperação.....	62

7.0	Análise técnica do domínio de aplicabilidade.....	62
8.0	Controle positivo.....	63
9.0	Padrões de referência para calibração de instrumentos.....	63
10.0	Especificações de configuração .....	63

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de documentos existentes nos EUA e internacionais relacionados à validação, qualificação e uso regulatório de NAMs .....	3
<b>Tabela 2.</b> Artigos não publicados produzidos por grupos de trabalho do ICCVAM que fornecem detalhes sobre as necessidades de ensaios da agência para tópicos selecionados .....	7
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de endpoints em que a relevância biológica e mecanicista das NAMs foi demonstrada .....	9
<b>Tabela 4.</b> Usos selecionados de compostos de referência.....	12
<b>Tabela 5.</b> Ferramentas de qualidade frequentemente usadas na caracterização técnica de NAMs.....	18
<b>Tabela 6.</b> Avaliação do método analítico.....	22

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Conceitos-chave a serem considerados durante o desenvolvimento e a implementação de estratégias de validação de NAMs adequadas à finalidade e flexíveis. ....	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura para o desenvolvimento de NAMs robustas. ....	17
<b>Figura 1 complementar.</b> Fluxograma descrevendo o protocolo MTS modificado .....	54
<b>Figura 2 complementar.</b> Diagrama de causa e efeito .....	55
<b>Figura 3 complementar.</b> Dados de gráficos de controle.....	57
<b>Figura 4 complementar.</b> Correlação dos valores de EC <sub>50</sub> do de sulfato de cádmio .....	59

## **Siglas e abreviaturas**

Princípio dos 3Rs: substituição (replacement), redução (reduction) ou refinamento (refinement) do uso de animais

AOP: via de resultados adversos

C&E: causa e efeito

COU: contexto de uso

CPSC: Comissão de Segurança de Produtos de Consumo dos Estados Unidos (U.S. Consumer Product Safety Commission)

DA: abordagem definida

EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency)

EURL ECVAM: Laboratório de Referência da União Europeia para a Validação de Métodos Alternativos (European Union Reference Laboratory for the Validation of Alternative Methods)

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration)

GD: documento de orientação

GHS: Sistema Globalmente Harmonizado para Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals)

GIVIMP: documento de orientação sobre boas práticas de métodos in vitro

BPL: boas práticas de laboratório

IATA: Abordagens integradas de testes e avaliação (Integrated approaches to testing and assessment)

ICATM: Cooperação Internacional sobre Métodos Alternativos (International Cooperation on Alternative Test Methods)

ICCVAM: Comitê de Coordenação Interinstitucional para a Validação de Métodos Alternativos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)

ICH: Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)

**IQ/OQ/PQ:** Qualidade da instalação/Qualidade da operação/Qualidade do desempenho

**JaCVAM:** Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternatives Methods)

**MTS:** (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

**NAMs:** novas metodologias de abordagem (New approach methodologies)

**NCATS:** Centro Nacional para o Avanço das Ciências Translacionais (National Center for Advancing Translational Sciences)

**NICEATM:** Centro Interinstitucional do Programa Nacional de Toxicologia para a Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)

**NIEHS:** Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental (National Institute of Environmental Health Sciences)

**OD:** densidade óptica

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

**SOP:** procedimento operacional padrão

**TG:** diretriz de ensaio

**Tox21:** Toxicologia no século 21

**TSAR:** Sistema de rastreamento de métodos alternativos para aceitação regulatória (Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance)

## **Grupo de trabalho de validação do ICCVAM**

### **Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e de Doenças (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)**

Moiz Mumtaz, PhD

### **Comissão de segurança de bens de consumo**

John Gordon, PhD (copresidente)

### **Departamento de Defesa dos Estados Unidos (U.S. Department of Defense)**

Donald Cronce, PhD

Natalia Garcia-Reyero Viñas, PhD

Matthew Johnson, DVM, DACLAM (até junho de 2022)

Emily N. Reinke, PhD (até abril de 2022)

### **Departamento de Assuntos de Veteranos dos EUA (Department of Veterans Affairs)**

George Lathrop, Jr., DVM, MS, DACLAM

### **Agência de Proteção Ambiental dos EUA (U.S. Environmental Protection Agency)**

#### *Agência de Programas de Pesticidas (Office of Pesticide Programs)*

Anna Lowi, PhD

Scott Lynn, PhD

Monique Perron, ScD

#### *Agência de Pesquisa e Desenvolvimento (Office of Research and Development)*

Kelly Carstens, PhD

Alison Harrill, PhD

Nisha Sipes, PhD

### **Food and Drug Administration**

#### *Centro de Dispositivos e Saúde Radiológica (Center for Devices and Radiological Health)*

Jennifer Goode, BS

#### *Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos (Center for Drug Evaluation and Research)*

Paul C. Brown, PhD

*Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada*

Suzanne Fitzpatrick, PhD (copresidente)

Anneliese Striz, PhD

*Centro de produtos de tabaco (Center for Tobacco Products)*

Jueichuan (Connie) Kang, PhD

*Gabinete do cientista-chefe*

Tracy Chen, PhD

**Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental (National Institute of Environmental Health Sciences)**

Warren Casey, PhD

*Centro Interinstitucional do Programa Nacional de Toxicologia para a Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)*

Helena Hogberg, PhD

Nicole Kleinstreuer, PhD

**Instituto Nacional da Saúde (National Institutes of Health)**

*Centro Nacional para o Avanço das Ciências Translacionais (National Center for Advancing Translational Sciences)*

Dr. Menghang Xia

**Instituto Nacional de Normas e Tecnologia (National Institute of Standards and Technology)**

Elijah Petersen, PhD (copresidente)

**Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (Occupational Safety and Health Administration)**

Janet Carter, MS

**Equipe contratada de suporte do NICEATM (Inotiv)**

David Allen, PhD (até dezembro de 2023)

Michaela Blaylock

Amber Daniel, MTox

Agnes Karmaus, PhD (até abril de 2023)

## **Representantes da Agência ICCVAM**

Composição do comitê do ICCVAM no momento da publicação deste relatório

\*Representante da agência principal; +Representante alternativo da agência principal

### **Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e de Doenças (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)**

- \* Moiz Mumtaz, PhD
- Patricia Ruiz, PhD

### **Comissão de Bens de Consumo dos Estados Unidos (U.S. Consumer Product Safety Commission)**

- \* John Gordon, PhD
- + Kristina Hatlelid, PhD, MPH
- + Eric Hooker, MS
- + Joanna Matheson, PhD

### **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (U.S. Department of Agriculture)**

- \* Jessie Carder
- + Patrice Klein, MS, VMD, DACPV, DACVPM
- Erika Edwards
- Ben Green, PhD
- Katherine Horak, PhD

### **Departamento de Defesa dos Estados Unidos (U.S. Department of Defense)**

- \* Shannon Marko, DVM, DACLAM
- + Natalia Garcia-Reyero Vinas, PhD (copresidente)
- + Saber Hussain, PhD, associado ao ATS, associado ao AFRL
- + Elaine Merrill, PhD
- Matthew Grogg, PhD
- Donald Cronce, PhD

### **Departamento de Energia dos Estados Unidos (U.S. Department of Energy)**

- R. Todd Anderson, PhD

**Departamento do Interior dos Estados Unidos (U.S. Department of the Interior)**

- \* Barnett A. Rattner, PhD
- + Jessica K. Leet, PhD

**Departamento de Transportes dos Estados Unidos (U.S. Department of Transportation)**

- \* Steve Hwang, PhD
- + Rebecca Rothhaas
- + Ryan Vierling, PhD

**Escritório de Pesquisa e Desenvolvimento do Departamento de Assuntos de Veteranos dos EUA (U.S. Department of Veterans Affairs Office of Research and Development)**

- \* Holly Krull, PhD
- + George Lathrop, Jr., DVM, MS, DACLAM

**Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency)**

*Agência de Segurança Química e Prevenção da Poluição (Office of Chemical Safety and Pollution Prevention)*

Charles Kovatch

*Agência de Programas de Pesticidas (Office of Pesticide Programs)*

Monique Perron, PhD

William (Bill) Eckel, PhD

Cecilia Tan, PhD

*Agência de Prevenção de Poluição e Tóxicos (Office of Pollution Prevention and Toxics)*

- \* Anna Lowit, PhD
- Louis (Gino) Scarano, PhD

*Agência de Pesquisa e Desenvolvimento (Office of Research and Development)*

- + Alison Harrill, PhD
- Kelly Carstens, PhD
- Grace Patlewicz, PhD

**Food and Drug Administration**

*Centro de Avaliação e Pesquisa Biológica (Center for Biologics Evaluation and Research)*

Leslie Wagner

Allen Wensky, PhD

*Centro de Dispositivos e Saúde Radiológica (Center for Devices and Radiological Health)*

+ Jennifer Goode, BS

Simona Bancos, PhD

Rakhi M. Dalal-Panguluri, PhD

*Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos (Center for Drug Evaluation and Research)*

Paul C. Brown, PhD

Nakissa Sadrieh, PhD

*Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada (Center for Food Safety and Applied Nutrition)*

\* Suzanne Fitzpatrick, PhD (copresidente)

Omari J. Bandele, PhD

Patrick Crittenden, PhD

Shruti Kabad, PhD

*Centro de produtos de tabaco (Center for Tobacco Products)*

Jueichuan (Connie) Kang, PhD

*Centro de Medicina Veterinária*

M. Cecilia Aguila, DVM

Li You, PhD

*Centro Nacional de Pesquisa Toxicológica (National Center for Toxicological Research)*

Mugimane (Manju) Manjanatha, PhD

*Gabinete do cientista-chefe (Office of the Chief Scientist)*

Tracy Chen, PhD

Chad P. Nelson, PhD, MSPH

**Instituto Nacional do Câncer (National Cancer Institute)**

\* Brian Cholewa, PhD

+ Ron Johnson, PhD

Gary Robinson, PhD

**Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (National Institute for Occupational Safety and Health)**

\* Stephen Leonard, PhD

**Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental (National Institute for Environmental Health Sciences)**

\* Warren Casey, PhD

+ Stephen Ferguson, PhD

+ David M. Reif, PhD

Nicole Kleinstreuer, PhD

**Instituto Nacional de Normas e Tecnologia (National Institute of Standards and Technology)**

\* John Elliott, PhD

+ Elijah Petersen, PhD

**Instituto Nacional da Saúde (National Institutes of Health)**

\* Nicolette Petervary, VMD, MS, DACAW

Michael Eichner, DVM, DACLAM

**Biblioteca Nacional de Medicina (National Library of Medicine)**

\* Dina N. Paltoo, PhD, MPH, CPI

**Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (Occupational Safety and Health Administration)**

\* Deana Holmes, MT

+ Janet Carter, MS

## **Isenção de responsabilidade**

Este relatório foi desenvolvido como um recurso para agências federais dos EUA e demais interessados que buscam estabelecer confiança em novas abordagens que substituam, reduzam ou refinem o uso de animais em ensaios. Os princípios descritos neste relatório foram desenvolvidos com a contribuição da equipe de 17 agências federais, vários grupos de trabalho interagências, do público e do Comitê Consultivo Científico sobre Métodos Toxicológicos Alternativos. Assim sendo, este relatório não reflete necessariamente as opiniões ou políticas de qualquer agência ou grupo de trabalho. Ele não cria direitos para nenhuma pessoa ou parte e não deve ser considerado como um compromisso de qualquer agência federal. Este relatório não estabelece nenhuma responsabilidade legalmente aplicável. Este relatório apenas descreve o pensamento atual do Comitê Coordenador Interinstitucional para a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) sobre determinado assunto e deve ser visto apenas como uma recomendação, a menos que requisitos regulamentares ou estatutários específicos sejam citados. O uso da palavra “deveria” significa que algo é sugerido ou recomendado, mas não obrigatório.

## **Resumo geral**

Novas metodologias de abordagem (NAMs) estão sendo desenvolvidas com frequência cada vez maior e são utilizadas para fornecer avaliações regulatórias e não regulatórias dos possíveis efeitos tóxicos de compostos químicos e produtos na saúde humana e no meio ambiente. Essas NAMs estão sendo usadas para investigar os mecanismos biológicos subjacentes aos processos toxicológicos, auxiliar na avaliação de produtos novos e existentes e gerar informações sobre identificação de perigos e relação dose-resposta para fins de classificação de perigos sanitários e ambientais e avaliação de riscos. Este relatório foi desenvolvido pelo ICCVAM para ajudar desenvolvedores e usuários finais a gerar confiança nas NAMs. Essa confiança pode ser alcançada por meio da implementação de estratégias de validação adequadas à finalidade e flexíveis que levem em consideração a aplicação pretendida da NAM. Este relatório ajuda a gerar confiança ao descrever conceitos como contexto de uso, relevância biológica e caracterização técnica das NAMs. O relatório analisa a aceitação regulatória das NAMs pelas agências federais dos EUA e o potencial de harmonização internacional, e analisa as práticas recomendadas para ferramentas de qualidade e avaliação técnica das NAMs. O relatório também enfatiza a necessidade de comunicação entre desenvolvedores, usuários finais e agências reguladoras. A estratégia desatualizada de validação única para todos não funciona em um campo avançado como NAMs. O ICCVAM é uma organização que pode auxiliar nessa transição para abordagens mais modernas exercendo uma função consultiva, por meio da coordenação de iniciativas de validação e do estabelecimento de oportunidades de colaboração em pesquisas. Portanto, o ICCVAM desenvolveu este relatório, em cooperação com 17 agências reguladoras federais e laboratórios de pesquisa, para ajudar desenvolvedores, usuários finais e agências reguladoras a gerar confiança nas NAMs para que possam ser implementadas para complementar ou substituir ensaios em animais para fins regulatórios e não regulatórios.

## 1.0 Introdução

O Comitê Coordenador Interinstitucional para a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) é composto por representantes de 17 agências reguladoras e de pesquisa federais dos EUA que exigem, usam, geram ou divulgam informações sobre ensaios toxicológicos e de segurança. O ICCVAM realiza avaliações técnicas de métodos de ensaio de segurança novos, revisados e alternativos e estratégias de teste integradas com aplicabilidade regulatória. O ICCVAM também promove a validação científica e a aceitação ou qualificação regulatória de métodos de ensaio que avaliam com exatidão a segurança química e os perigos de produtos relevantes como uma iniciativa para substituir, reduzir ou refinar (melhorar o bem-estar animal e diminuir ou evitar dor e sofrimento) no uso de animais.

Logo após seu estabelecimento como comitê permanente em 1997, o ICCVAM publicou um relatório, “Validação e aceitação regulatória de métodos de ensaio toxicológico” (ICCVAM, 1997), descrevendo os critérios para a validação e aceitação regulatória de métodos de ensaio novos e alternativos. Orientações adicionais foram fornecidas posteriormente na publicação de 2003, “Diretrizes do ICCVAM para a nomeação e apresentação de métodos de ensaio novos, revisados e alternativos” (ICCVAM, 2003). Os princípios descritos nesses documentos foram implementados no desenvolvimento dos critérios internacionais descritos no Documento de Orientação (GD) 34 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), “Documento de orientação sobre a validação e aceitação internacional de métodos de ensaio novos ou atualizados para avaliação de perigos” (OCDE, 2005). Esses recursos descreveram um modelo de validação que é flexível em princípio, mas demonstra várias limitações na prática, como demora e consumo de muitos recursos. Em alguns contextos de uso, os métodos podem não precisar passar por todas as etapas desse processo de validação para gerar dados valiosos para uma agência federal. Além disso, esses documentos nem sempre são compatíveis com muitas abordagens modernas de ensaios de toxicidade, que colocam menor ênfase na substituição de ensaios *in vivo* por um único método alternativo e maior ênfase na integração de resultados de vários ensaios *in vitro* e *in chemico* e abordagens *in silico* (por exemplo, modelos computacionais). A publicação do ICCVAM de 2018, “Roteiro estratégico para estabelecimento de novas abordagens para avaliar a segurança de produtos químicos e médicos nos Estados Unidos” (“A Strategic Roadmap for Establishing New Approaches to Evaluate the Safety of Chemicals and Medical Products in the United States”) (ICCVAM, 2018), fornece uma estrutura conceitual que promove melhor comunicação entre agências e desenvolvedores de métodos de ensaio e maior flexibilidade na forma como a confiança é estabelecida, para ajudar a garantir a adoção de novos métodos por agências federais e indústrias regulamentadas, uma vez validados para uma aplicação ou contexto de uso específico (COU). O texto a seguir fornece uma visão mais específica sobre o estabelecimento de confiança em novas metodologias de abordagem (NAMs) baseadas nos princípios descritos no Roteiro do ICCVAM de 2018.

No contexto deste relatório, o termo NAM se refere a qualquer tecnologia, metodologia, abordagem ou combinação delas que possa ser usada para fornecer informações sobre perigos e riscos químicos e corroborar a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais (3Rs). Este relatório se baseia nos princípios articulados nas diretrizes e documentos existentes (Tabela 1) aceitos pelos EUA e internacionalmente para propor uma abordagem mais flexível em gerar

confiança nas NAMs. Aqui, apresentamos os principais conceitos de validação, qualificação e aceitação regulatória aplicáveis a NAMs, que incluem ensaios em um sistema biológico (por exemplo, *in vitro*, alguns ensaios *in chemico*, pequenos organismos-modelo), reconhecendo que considerações adicionais podem ser necessárias para outros tipos de NAMs, como previsões de modelos computacionais (OECD, 2007).

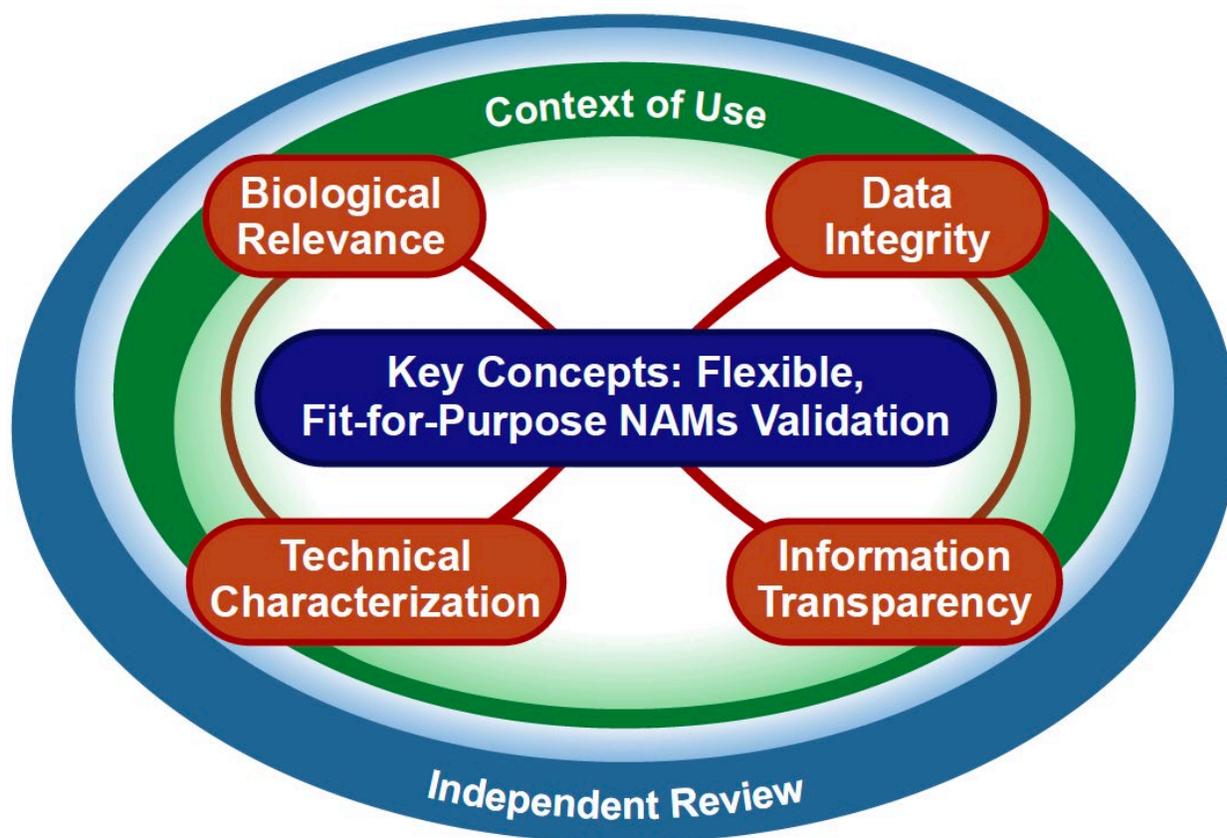
**Tabela 1.** Exemplos de documentos existentes nos EUA e internacionais relacionados à validação, qualificação e uso regulatório de NAMs

<b>Título do documento</b>	<b>Referência</b>
Validação e aceitação regulatória de métodos de ensaio toxicológico (Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods) (descontinuado a partir da publicação deste relatório)	ICCVAM, 1997
<a href="#">Diretrizes do ICCVAM para a nomeação e apresentação de métodos de ensaio novos, revisados e alternativos</a>	ICCVAM, 2003
<a href="#">Série da OCDE sobre testes e avaliações nº 34: documento de orientação sobre a validação e aceitação internacional de métodos de ensaio novos ou atualizados para avaliação de perigos</a>	OCDE, 2005
<a href="#">Procedimentos recomendados em relação à política do CPSC sobre ensaios em animais</a>	CPSC, 2012
<a href="#">Roteiro de toxicologia preditiva da FDA</a>	FDA, 2017a
<a href="#">Qualificação de ferramentas de desenvolvimento de dispositivos médicos: orientação para a indústria, desenvolvedores de ferramentas e funcionários da FDA</a>	FDA, 2017b
<a href="#">Plano estratégico da EPA para promover o desenvolvimento e implementação de métodos de ensaio alternativos dentro do programa TSCA</a>	EPA, 2018
<a href="#">Roteiro estratégico para o estabelecimento de novas abordagens de avaliação da segurança de produtos químicos e de produtos hospitalares nos Estados Unidos</a>	ICCVAM, 2018
<a href="#">Documento de orientação sobre boas práticas de métodos <i>in vitro</i> (Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) (GIVMP)</a>	OCDE, 2018
<a href="#">Orientação para desenvolvedores da indústria e de métodos de ensaio: Avaliação da equipe do CPSC de métodos de ensaio alternativos e abordagens de teste integradas e dados gerados a partir desses métodos para fundamentar os requisitos de rotulagem da FHSA</a>	CPSC, 2020

<b>Título do documento</b>	<b>Referência</b>
<a href="#">Orientação do processo de qualificação para ferramentas de desenvolvimento de medicamentos para a indústria e funcionários da FDA</a>	FDA, 2020
<a href="#">Plano de trabalho de métodos de nova abordagem da EPA</a>	EPA, 2021a
<a href="#">Plano estratégico da EPA para reduzir o uso de animais vertebrados em ensaios químicos</a>	EPA, 2021b
<a href="#">Desenvolvendo novas metodologias alternativas na FDA (Advancing New Alternative Methodologies at FDA)</a>	FDA, 2021a

## **2.0 Conceitos-chave em validação de NAMs adequadas à finalidade e flexíveis**

Os princípios de validação subjacentes, descritos no GD 34 da OCDE, permanecem essenciais, mas os processos usados para validação devem permitir o desenvolvimento eficiente e oportuno de NAMs que sejam adequadas à finalidade, confiáveis e forneçam informações relevantes para a espécie de interesse. Especificamente, o GD 34 da OCDE afirma que “novos métodos de ensaio passam por validação para garantir que empreguem ciência robusta e atendam às necessidades regulatórias”, ou seja, que os métodos sejam adequados à finalidade, o que, além de fundamentar as decisões regulatórias, possam incluir a triagem e a priorização de casos de uso. A orientação também afirma que “o processo de validação deve ser flexível e adaptável” e que o desempenho deve ser “demonstrado usando uma série de produtos químicos de referência” e “avaliado em relação aos dados de toxicidade relevantes existentes” (OCDE, 2005). Dessa forma, a confiança nas NAMs não deve ser considerada um status universal concedido após a conclusão de um processo específico (por exemplo, considerar que uma NAM seja “validada” após a conclusão bem-sucedida de um estudo experimental interlaboratorial); em vez disso, o estabelecimento de confiança nas NAMs deve ser visto como um processo evolutivo e iterativo que requer comunicação entre desenvolvedores de métodos, tomadores de decisão regulatórios e órgãos de validação (ICCVAM, 2018).



**Figura 1.** Conceitos-chave a serem considerados durante o desenvolvimento e a implementação de estratégias de validação de NAMs adequadas à finalidade e flexíveis. Adaptado de van der Zalm et al. (2022).

Há vários conceitos-chave que devem ser considerados ao projetar e implementar estratégias de validação adequadas à finalidade e flexíveis, representados na Figura 1. Esses conceitos são amplamente aplicáveis ao uso de NAMs para várias finalidades, mas devem ser adaptados conforme a necessidade para o cenário e a aplicação específicos. Um conceito abrangente a ser considerado é o COU, ou a finalidade para a qual a NAM se destina (por exemplo, triagem, identificação de perigos, avaliação de potência, ponto de partida para avaliação quantitativa de riscos etc.). O COU indicará a flexibilidade do processo de validação e como a adequação da NAM para um COU específico é estabelecida. Os principais conceitos envolvidos nesse processo de validação adequada à finalidade e flexível são relevância biológica, caracterização técnica, integridade dos dados e transparência das informações. Como demonstrado na figura, esses aspectos são relacionados e interdependentes. Por fim, todas as partes do processo de validação devem ser submetidas a uma revisão independente. Esses conceitos-chave são semelhantes aos elementos essenciais propostos por van der Zalm et al. (2022) em um esquema elaborado para estabelecer confiança científica nas NAMs, mas estamos adaptando-os aqui para serem úteis para

uma gama mais ampla de aplicações de NAM. Cada um desses conceitos-chave é apresentado de forma mais detalhada na Seção 3.0.

### **3.0 Aplicação dos conceitos-chave para gerar confiança nas NAMs**

A validação deve ser um processo robusto, porém flexível, no qual a confiança científica é estabelecida determinando-se a adequação de uma NAM para um COU específico. Sempre que possível e adequado, deve haver evidências para indicar que o uso de um método alternativo fornecerá informações tão boas ou melhores do que o método existente e que levará a uma revisão regulatória de decisões que protegem a saúde humana. O COU determina os critérios detalhados e a implementação dos conceitos-chave. Para determinar se as NAMs são adequadas para uma finalidade específica, tanto o COU quanto a biologia relevante que a NAM se destina a abranger devem ser claramente definidos. A NAM deve ser bem descrita e fornecer informações tecnicamente confiáveis que sejam biologicamente relevantes e/ou preservem a saúde para o endpoint ou processo em questão. A composição das informações fornecidas pela NAM deve ser suficientemente transparente para permitir uma revisão independente para garantir integridade e confiabilidade. Quando apropriado e possível, a geração de confiança nas NAMs pode incluir a demonstração de que a NAM fornece informações de qualidade e relevância equivalentes ou melhores para a espécie de interesse para a tomada de decisões regulatórias, em comparação quantitativa ou qualitativa com as informações fornecidas pelo método de ensaio em animais tradicional. Para evitar uma limitação pelo status quo, deve-se reconhecer a possibilidade de a NAM fornecer informações de melhor qualidade e mais relevantes para a tomada de decisões regulatórias que o método de ensaio em animais tradicional. Isso requer uma estrutura de validação que permita essa possibilidade e considere circunstâncias nas quais uma comparação com dados de métodos de ensaio em animais tradicionais talvez não seja possível.

#### **3.1 Contexto de uso**

O estabelecimento de um COU, ou a utilização pretendida de uma NAM, inclui a elaboração de uma declaração que descreva completa e claramente a forma como a NAM deve ser usada e sua finalidade regulatória (se aplicável). As agências federais dos EUA operam de acordo com estatutos e regulamentos específicos de cada agência (ver, por exemplo, Shaffer, 2021) e, portanto, têm critérios diferentes para que uma NAM seja aceitável e aplicável aos requisitos individuais de cada agência. Em alguns casos, mesmo dentro de uma agência (por exemplo, diferentes centros da Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA [FDA], escritórios da Agência de Proteção Ambiental dos EUA [EPA]), pode haver necessidades diferentes dependendo da área de regulamentação. Isso é ainda mais complicado no nível internacional, pois as regulamentações de outros países podem diferir das regulamentações dos EUA, de modo que os métodos aceitáveis em um país para um determinado COU podem não ser aceitáveis em outros lugares. Assim, mesmo que uma NAM possa ser validada para abordar um endpoint específico para um (ou vários) COU sob uma orientação/regulamento específico, ela pode não ser considerada aceitável sob uma orientação/regulamentação diferente entre várias agências, jurisdições regulatórias e países. Para entender melhor esse cenário regulatório diversificado, o

ICCVAM coletou informações de diversas agências, tanto nacional quanto internacionalmente, para caracterizar as necessidades específicas da agência para determinados parâmetros de toxicidade (NIEHS, 2023a; exemplos mostrados na Tabela 2).

**Tabela 2.** Artigos não publicados produzidos por grupos de trabalho do ICCVAM que fornecem detalhes sobre as necessidades de ensaios da agência para tópicos selecionados

<b>Foco necessário em ensaios</b>	<b>Referência</b>
Ensaio de toxicidade aguda	Strickland et al., 2018
Ensaio de ecotoxicidades	Ceger et al., 2022
<i>Extrapolação in vitro para in vivo</i>	Chang et al., 2022
Ensaio de nanomateriais usando NAMs	Petersen et al., 2022a
Sensibilização cutânea	Daniel et al., 2018; Strickland et al., 2019
Ensaio de irritação cutânea e ocular	Choksi et al., 2019

NAMs com diferentes COUs, como triagem/priorização e identificação de perigos, podem ser diferentes daquelas projetadas para responder a perguntas específicas sobre mecanismos toxicológicos e/ou respaldar avaliações quantitativas de risco e, como tal, diferentes critérios podem ser desenvolvidos e aplicados para avaliar e validar NAMs para cada finalidade. Muitos novos métodos são desenvolvidos em ambientes acadêmicos para abordar questões básicas de pesquisa que podem ser de natureza específica ou exploratória. Ocasionalmente, reconhece-se que um desses métodos possa ter o potencial de desempenhar um papel diferente da pesquisa básica em áreas mais aplicadas, como a tomada de decisões regulatórias. É importante que os desenvolvedores de novos métodos se reúnam com agências federais e/ou usuários pretendidos ou partes interessadas antes de validar uma NAM para garantir que os estudos de validação projetados para estabelecer confiança sejam adaptados adequadamente ao COU pretendido.

Outras NAMs podem ser mais úteis para descoberta e desenvolvimento de produtos. Uma NAM pode ser adotada para rastrear novas moléculas para atividades desejáveis (por exemplo, farmacológicas) ou potencialmente indesejáveis (tóxicas). Esses dados podem ser usados para tomar decisões sobre quais moléculas devem ser usadas para um desenvolvimento posterior. A padronização dos métodos de ensaio pode auxiliar na inovação, concentrando esforços e recursos em novas descobertas tecnológicas ou terapêuticas, em vez de desenvolvimento ou teste de métodos. Esses usos de NAMs tendem a estar fora do escopo da autoridade reguladora da maioria das agências federais. No entanto, ainda é recomendado que os conceitos-chave para estabelecer a confiança científica nas NAMs sejam aplicados para garantir quedados de alta qualidade sejam obtidos. É reconhecido que esses usos de NAMs podem apoiar diretamente os 3Rs e fornecer dados e experiências preliminares que podem auxiliar no desenvolvimento adicional de uma NAM, potencialmente permitindo seu uso para fins regulatórios.

## 3.2 Relevância biológica

A relevância de uma NAM descreve a relação entre o teste e o efeito na espécie-alvo e se o método de ensaio é significativo e útil para uma determinada finalidade, com as limitações identificadas. A demonstração adequada da relevância de uma NAM é um importante fator de contribuição para a confiança em uma NAM. A relevância biológica pode ser demonstrada de várias maneiras, dependendo das informações disponíveis, como detalhado abaixo.

As considerações sobre a relevância biológica detalhadas nas seguintes subseções incluem:

- Qual tipo de informação a NAM fornece? Existe uma compreensão da biologia e dos mecanismos que levam ao resultado/endpoint?
- Quais dados de referência estão disponíveis para comparar o resultado que a NAM deve questionar?
- Quais são as considerações sobre se, e como, comparar os resultados de uma NAM com um método de laboratório consolidado?

Considerações adicionais sobre a relevância biológica também podem ser importantes, dependendo das circunstâncias específicas do pedido de validação.

### 3.2.1 Compreensão mecanicista

A consideração da biologia das espécies de interesse (geralmente humanas, mas frequentemente outras espécies) é importante ao avaliar a relevância de uma NAM. As comparações das informações fornecidas pela NAM com a biologia *in vivo* devem ser corroboradas, sempre que possível, pelo conhecimento mecanicista existente (por exemplo, uma via de resultados adversos [AOP] ou processo biológico toxicologicamente relevante). Ancorar uma NAM a uma AOP estabelecido por meio de um evento de iniciação molecular ou de um ou mais eventos importantes pode ajudar a demonstrar a relevância biológica da NAM. Por outro lado, a falta de uma AOP estabelecida para o resultado previsto por uma NAM não impede necessariamente que a NAM possa ser útil e essas informações de apoio podem vir de insights mecanicistas fornecidos por dados *in vivo* e compreensão da biologia das espécies-alvo. É importante que uma NAM seja caracterizada de forma abrangente e descreva com clareza qual evento biológico está sendo medido e como ele se relaciona com o resultado adverso ou o perigo em questão.

Uma descrição da NAM deve abordar a plausibilidade biológica do modelo para prever resultados *in vivo* e/ou fornecer uma ligação mecanicista a um processo biológico, mecanismo ou AOP. Por exemplo, se uma NAM pretende prever a possibilidade de um medicamento humano induzir malformações fetais ou letalidade embriofetal, deve haver uma compreensão dos mecanismos de desenvolvimento embriofetal (por exemplo, migração celular, diferenciação, vasculogênese, neurulação, gastrulação) e a conexão com os efeitos adversos subsequentes do desenvolvimento estudados com o modelo (FDA, 2021b). Embora a relação com o efeito *in vivo* previsto possa ser de natureza correlativa, é mais desafiador gerar confiança nas previsões de NAM apenas a partir de relações correlativas ou empíricas; portanto, são preferíveis testes com clara relevância biológica para o processo que está sendo avaliado. A ausência de uma

compreensão da relevância biológica e mecanicista de uma NAM pode restringir sua aplicabilidade a limites estritamente definidos pelos dados usados para validar a NAM e dificultar a extensão das NAMs a classes químicas fora daquelas usadas para estabelecer e validar a NAM.

Uma AOP é uma estrutura organizacional útil para vincular perturbações moleculares e celulares a resultados adversos à saúde e pode ser usada para desenvolver e ancorar NAMs que representam processos toxicológicos importantes. Existem exemplos de endpoints que têm AOPs bem estabelecidas, como sensibilização cutânea (Kleinstreuer et al., 2018). Para endpoints sem AOPs bem estabelecidas, a relevância mecanicista da NAM pode, em vez disso, ser considerada com base em fatores como vias ou processos biológicos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Exemplos de endpoints em que a relevância biológica e mecanicista das NAMs foi demonstrada\*

<b>Endpoint</b>	<b>Resumo</b>	<b>Referências</b>
Sensibilização cutânea	O endpoint tem uma AOP relevante para humanos bem desenvolvida, na qual abordagens definidas combinando várias NAMs são mapeadas e descritas na Diretriz 497 da OCDE.	Kleinstreuer et al., 2018; OCDE, 2021a
Desregulação endócrina	Modelos de vias estabelecidas usando NAMs complementares como parte de uma estratégia integrada estão disponíveis para a atividade do receptor de estrogênios e androgênios. A EPA aceita essas NAMs para triagem de nível 1 no Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos.	Judson et al., 2015; Kleinstreuer et al., 2017; EPA, 2023
Neurotoxicidade do desenvolvimento	Existem AOPs limitadas para esse endpoint complexo. Em vez disso, uma bateria de NAMs abrangendo processos críticos do neurodesenvolvimento humano foi desenvolvida. Está disponível um GD da OCDE na bateria que inclui estudos de caso de Abordagens Integradas de Teste e Avaliação (IATA).	Crofton e Mundy, 2021; OCDE, 2022a; OCDE, 2023

Endpoint	Resumo	Referências
Toxicidade inalatória	Uma abordagem alternativa usando um ensaio <i>in vitro</i> baseado em células humanas e modelagem computacional foi usada para derivar um ponto de partida para uso na avaliação de risco à saúde humana da EPA. Essa abordagem também foi publicada como um estudo de caso da OCDE IATA.	Corley et al., 2021; EPA, 2021c; OECD, 2022b
Irritação ocular	Um documento de orientação que descreve uma estrutura de ensaio alternativa para avaliar o potencial de irritação ocular de pesticidas e produtos pesticidas. Os métodos de ensaio disponíveis <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> foram revisados com relação à sua relevância para a anatomia ocular humana e os mecanismos de toxicidade.	EPA, 2015; Clippinger et al., 2021
Irritação cutânea	Um documento de orientação propondo um IATA para corrosão e irritação da pele usando informações existentes, propriedades físico-químicas e outros métodos não testados.	OCDE, 2014

\*Consulte as orientações específicas da agência para aceitação de diferentes NAMs.

Idealmente, a descrição da relação da NAM com o efeito biológico de interesse deve ser baseada nas informações disponíveis sobre a biologia ou mecanismo de ação relevante para o endpoint em questão na espécie de interesse. Em alguns casos, isso pode não ser possível e dados de uma espécie diferente da espécie de interesse podem constituir a única base disponível para comparação. No entanto, a fisiologia das espécies de interesse pode diferir das espécies de ensaio substitutas existentes, enfatizando ainda mais a necessidade de incorporar a compreensão mecanicista na avaliação da NAM. Por exemplo, os aspectos anatômicos e fisiológicos do olho do coelho diferem dos olhos humanos (Clippinger et al., 2021) e as janelas de suscetibilidade durante o desenvolvimento encefálico são diferentes entre as espécies (Smirnova et al., 2014; Tsuji e Crofton, 2012). Como consequência, a relevância biológica para a espécie de interesse e as principais considerações de exposição devem ser reconhecidas na avaliação da NAM e do método de ensaio de referência existente. As avaliações de relevância biológica e mecanicista podem considerar, por exemplo, a relevância do tipo de célula usado, as características fisiológicas do órgão/tecido relevante em investigação ou a presença de metabólitos relevantes para a espécie associados à substância em estudo (considerando-se que os metabólitos encontrados em uma espécie podem ser diferentes daqueles encontrados em outra ou produzidos em uma NAM). Além disso, pode-se examinar a capacidade de um método avaliar um modo de ação ou mecanismo específico para a espécie (Hartung, 2010; Madia et al., 2021; Parish et al., 2020).

Indo além da transposição de uma espécie para outra, a variação entre indivíduos (por exemplo, doadores de células ou tecidos usados em ensaios *in vitro*) também pode estar por trás da variação biológica que pode afetar a resposta sendo medida, bem como potencialmente adicionar informações sobre a variabilidade interindividual em uma população (Harrill, 2020). Embora não seja abordado extensivamente no presente documento, os usuários e desenvolvedores de NAMs devem estar cientes de que a observação de um efeito (com relação à magnitude e, em alguns casos, à presença do efeito observado), bem como o ponto de partida ou dose em que o efeito ocorre, pode ser modulada pela variação da sequência genética presente em um painel de linhas celulares (Chiu et al., 2017). O uso de painéis de linhas celulares geneticamente diversas em ensaios celulares pode oferecer vantagens na compreensão da dinâmica populacional de toxicidade e resposta fenotípica (Harrill e McAllister, 2017), descobrindo variantes da sequência genética que conferem suscetibilidade (Frick et al., 2015), permitindo a identificação de subpopulações especialmente suscetíveis (Church et al., 2015) e permitindo a medição da variabilidade toxicocinética e toxicodinâmica (Rusyn et al., 2022). Embora as linhagens celulares derivadas de tumores às vezes sejam usadas em modelos *in vitro*, sua composição genética pode não representar adequadamente a variação genética na população. As recomendações específicas para incorporar a diversidade nas NAMs dependerão do contexto. Conseqüentemente, projetos de estudo adequados à finalidade devem ser desenvolvidos em cooperação com geneticistas para garantir a cobertura adequada da variação das espécies-alvo, bem como com bioeticistas e os devidos grupos de partes interessadas, caso a variação genética humana seja questionada (ver, por exemplo, ICCVAM, 2022). As recomendações específicas para avaliar a variação interindividual estão além do escopo deste relatório e provavelmente continuarão a evoluir com a ciência emergente nessa área.

Em alguns casos, AOPs complexas ou resultados advindos de mais de uma AOP podem exigir que vários aspectos do mecanismo do resultado adverso sejam avaliados para obter uma previsão adequada do resultado. As NAMs geralmente têm limitações que não permitem que sejam preditivas ou tecnicamente aplicáveis a todas as classes químicas. A NAM também pode ser limitada em relação à complexidade da biologia que ela pode representar. A combinação de mais de uma NAM com diferentes desempenhos, aplicabilidade e coberturas biológicas em abordagens definidas (DAs) pode aumentar sua capacidade de prever resultados (OCDE, 2017). Isso pode ser alcançado mapeando NAMs adequadas para os principais eventos ao longo de uma AOP para garantir uma representação mecanicista suficiente para prever o resultado adverso relevante para a espécie de interesse. Um exemplo de mapeamento de NAMs para eventos importantes ao longo de uma AOP, resultando em uma DA para abordar um endpoint regulatório, está disponível na “Diretriz nº 497: abordagens definidas sobre sensibilização cutânea” (OCDE, 2021a).

### 3.2.2 Compostos de referência

Os compostos de referência podem ter uma ampla gama de possíveis finalidades, que vão desde a execução de um ensaio até a avaliação de sua qualidade técnica e relevância biológica, como mostra a Tabela 4. Um composto de referência pode funcionar bem para uma finalidade, mas não ser adequado para outra. Por exemplo, um composto de referência pode funcionar bem para um determinado método como um controle positivo (por exemplo, um ensaio de neurotoxicidade do

desenvolvimento), mesmo que não resulte no efeito adverso implicado na espécie-alvo (por exemplo, devido à incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica) e, portanto, pode não

<b>Conjuntos de compostos distintos*</b>	<b>Finalidade(s)</b>	<b>Crítérios para seleção de compostos</b>
<b>Controle(s) positivo(s)</b>	Verifique se o método está funcionando conforme o esperado.	Compostos que foram verificados como causadores de uma mudança confiável, mensurável e estatisticamente significativa em uma leitura específica do ensaio sob as condições do método.
<b>Compostos de desempenho</b>	Avaliar até que ponto um método novo ou modificado é equivalente a um método similar consolidado - "me-too".	Um conjunto de compostos que induzem de forma confiável uma resposta (ou nenhuma resposta) no método já consolidado.
<b>Compostos de proficiência</b>	Avaliar o desempenho de um novo laboratório usando um método consolidado.	Compostos que induzem uma resposta (ou nenhuma resposta) de forma confiável no método consolidado; podem ser um subconjunto de compostos de desempenho.
<b>Compostos de referência biológicos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Avaliar a relevância biológica de um método.</li> <li>2) Comparar a concordância para métodos projetados para medir um resultado relevante para o mesmo endpoint <i>in vivo</i>, mas que usam um contexto diferente (por exemplo, diferentes espécies, métodos ou modalidade de medição).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Compostos com evidência de efeito <i>in vivo</i> (positivo) ou nenhum efeito (negativo) para o endpoint de interesse (idealmente do organismo-alvo de interesse ou de uma espécie comparadora adequada).</li> <li>2) Um conjunto comum de compostos que foram testados para o endpoint de interesse em pelo menos um método confiável.</li> </ol>

ser adequado como um composto de referência biológico. Dependendo do COU, os compostos de referência podem incluir produtos químicos monoconstituintes, misturas ou extratos complexos (por exemplo, de dispositivos médicos).

**Tabela 4.** Usos selecionados de compostos de referência

\*Pode haver sobreposição de compostos elegíveis nesses conjuntos.

Um aspecto fundamental da demonstração da validade científica de uma NAM é a avaliação de seu desempenho em relação aos métodos de ensaio existentes em uso, geralmente por meio do teste de compostos de referência biológicos cujas atividades biológicas são bem caracterizadas e compreendidas. Os compostos de referência biológica geralmente incluem compostos que demonstraram efeitos adversos, idealmente com uma variedade de potências, ou a ausência de tais efeitos (Browne et al., 2019).

Pode ser desafiador identificar compostos biológicos de referência com efeitos conhecidos para resultados apicais específicos. Isso é particularmente verdadeiro para humanos, em que muitas vezes faltam dados, já que o campo da toxicologia tem sido aplicado para evitar a exposição humana a produtos químicos potencialmente perigosos. O sucesso dessa iniciativa significa que os dados humanos disponíveis são limitados ou que tais substâncias não foram adequadamente caracterizadas ou medidas em populações humanas. Quando esses dados humanos estão disponíveis, podem ser derivados de exposições acidentais ou exposições de baixo nível, que geralmente fornecem dados quantitativos limitados sobre os níveis ou resultados de exposição. Os estudos de caso podem fornecer indicações de perigo, mas geralmente não são adequados para estabelecer correlações claras de causa e efeito.

Apesar desses desafios, deve haver iniciativas para identificar compostos com efeitos humanos relacionados ao resultado ou mecanismo previsto pela NAM em desenvolvimento. Mesmo que esses dados sejam limitados em sua capacidade de fundamentar a avaliação quantitativa do método, eles podem fornecer uma verificação qualitativa da relevância da NAM. Também pode ser difícil obter dados epidemiológicos humanos de alta qualidade e alinhá-los com os dados toxicológicos; no entanto, os dados epidemiológicos são úteis na identificação de substâncias químicas ambientais com fortes associações com efeitos adversos à saúde humana. Estruturas baseadas em evidências foram desenvolvidas para permitir a compilação de grandes quantidades de informações, seguida por uma seleção transparente e objetiva de conjuntos de dados mais restritos e relevantes (Wikoff et al., 2020), melhorando assim a acessibilidade dos dados. Essas estruturas incluem mapas de evidências sistemáticos, que fornecem uma visão geral ampla de uma base de evidências, e revisões sistemáticas subsequentes, que fornecem uma avaliação mais restrita e abrangente de uma questão de pesquisa específica, permitindo uma integração mais rápida dos dados epidemiológicos humanos com outras fontes de informações existentes (Wolffe et al., 2019). Em combinação com linhas mecanicistas de evidência e dados antigos de animais, esses dados podem ser usados para definir compostos de referência biológicos para ajudar a estabelecer confiança científica nas NAMs (vide Krishna et al., 2021, por exemplo).

Sempre que possível, compostos que tenham demonstrado a produção de efeitos relevantes nas espécies de interesse devem ser usados como controles positivos durante a avaliação da robustez e relevância da NAM. Petersen (2021) descreveu as características que devem ser consideradas ao escolher controles positivos (por exemplo, produtos químicos testados usando medições de controle internas de processos cada vez que o ensaio é realizado) e muitas das mesmas considerações serão relevantes para compostos de referência na avaliação de uma NAM. Compostos de referência biológicos positivos e negativos, compostos de desempenho e compostos de proficiência devem ser incluídos e selecionados com o mesmo cuidado. Devido ao viés histórico na literatura que enfatiza resultados positivos (reconhecendo que nem todos os

positivos relatados na literatura são verdadeiros positivos), compostos de referência confiáveis que sejam negativos para o endpoint-alvo podem ser mais difíceis de identificar. As iniciativas de curadoria de dados com foco em resultados negativos devem ser bastante consideradas para publicação, e as iniciativas que testam compostos em concentrações relativamente altas em uma ampla gama de alvos podem fornecer informações valiosas para ajudar a resolver esse problema.

Talvez nem todos os COUs estejam presentes uma lista definitiva, e a seleção de compostos de referência deve considerar as necessidades regulatórias específicas desse COU. Em alguns casos, também pode ser apropriado definir subconjuntos de compostos de referência do endpoint biológico com relação ao mecanismo que está sendo avaliado (em vez do endpoint apical) para cada NAM dentro de uma bateria. Por exemplo, poucos compostos se qualificam como compostos de referência para neurotoxicidade no desenvolvimento e, em vez disso, cada processo avaliado na bateria (por exemplo, proliferação ou crescimento de neuritos) tem seus próprios compostos de referência biológicos específicos do ensaio. Como consequência, um composto de referência biológico final pode ser positivo em um ensaio, mas negativo em outro ensaio que esteja avaliando diferentes mecanismos ou processos.

São necessárias listas de compostos de referência (por exemplo, para avaliar a transferibilidade) no processo de validação formal descrito pela OCDE. No entanto, a compilação de compostos de referência confiáveis leva muito tempo e consome muitos recursos. As iniciativas de facilitar o rápido desenvolvimento de listas selecionadas de compostos de referência por meio de revisões sistemáticas rigorosas e processos de automação, quando possível, permitiram uma avaliação mais robusta da sensibilidade e especificidade da NAM (Judson et al., 2019; Thomas et al., 2019). Um exemplo de uma lista de compostos de referência biológica para qualificação de NAM está disponível na revisão da FDA de 2021 do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH), S5 (R3), Orientação de Detecção de Toxicidade Reprodutiva e de Desenvolvimento para Produtos Farmacêuticos Humanos para a Indústria (FDA, 2021b). A lista inclui compostos com desfechos positivos e negativos. A orientação indica que esses compostos, assim como outros, podem ser usados para respaldar a qualificação de um ensaio alternativo ou bateria de ensaios para COUs específicos.

### **3.2.3 Comparação com os métodos existentes em animais de laboratório**

O padrão para estabelecer confiança científica em uma NAM e obter aceitação regulatória geralmente incluía a consideração da capacidade de uma NAM fornecer informações sobre utilidade, qualidade científica e/ou relevância equivalentes ou melhores do que o método de ensaio existente usado para a tomada de decisões regulatórias (do modo apropriado dentro da estrutura regulatória de cada agência). Por exemplo, um critério no GD 34 da OCDE para validar qualquer novo método de ensaio é “o método gera dados para fins de avaliação de risco que são pelo menos tão úteis quanto e, de preferência, melhores que aqueles obtidos usando os métodos existentes. Isso proporcionará um nível comparável ou melhor de proteção à saúde humana ou ao meio ambiente” (OCDE, 2005). A Lei de Controle de Substâncias Tóxicas dos EUA alterada (seção 4(h)(1)(B)) inclui considerações específicas para NAMs e determina que a EPA incentive e facilite o “uso de métodos e estratégias de teste cientificamente válidos que reduzam ou

substituam o uso de animais vertebrados, fornecendo informações de qualidade e relevância científica equivalente ou melhor que fundamentarão as decisões regulatórias” (15 USC §2601, 2016).

Historicamente, o conceito de “equivalente ou melhor” se baseava em uma comparação direta com os dados tradicionais de ensaios em animais. No entanto, para atingir a meta de informações “melhores”, deve-se reconhecer que as NAMs podem não fornecer as mesmas informações geradas pelo método de ensaio tradicional em animais e os resultados da NAM podem não se alinhar diretamente com os resultados do ensaio em animais tradicional (por exemplo, vide Clippinger et al., 2021; Hoffmann et al., 2018, 2008; ICCVAM, 2018; Kolle et al., 2017; Petersen et al. al., 2022b; Piersma et al., 2018; Prior et al., 2019; Sewell et al., 2017). Em alguns casos, a NAM pode fornecer informações biologicamente relevantes, insights mecanicistas ou parâmetros suficientemente sensíveis que sejam adequados para o processo de tomada de decisão regulatória, e pode não ser necessário realizar uma comparação com dados de métodos de ensaio em animais tradicionais. Por exemplo, alguns alvos farmacológicos ou toxicológicos podem não existir em espécies não humanas, portanto, estudos em animais podem não ser relevantes para avaliar os possíveis efeitos humanos mediados por esses alvos. As NAMs baseadas em humanos podem fornecer informações biologicamente relevantes nesses casos. Além disso, as NAMs geralmente fornecem informações mecanicistas em vez de dados sobre parâmetros apicais medidos em métodos de ensaio com animais (por exemplo, embora uma redução observada no peso corporal em um animal possa não elucidar o mecanismo subjacente de toxicidade, as NAMs podem ser capazes de fornecer esses insights mecanicistas). Há também circunstâncias em que o modelo animal pode estar medindo um endpoint biológico complexo que é relevante para o COU, mas não está adequadamente abrangido pela NAM em questão. Nesses casos, uma comparação com os métodos de ensaio em animais tradicionais pode ser a opção mais conveniente, principalmente quando o mecanismo não é totalmente compreendido. O objetivo da avaliação da NAM é demonstrar que a NAM fornece informações que levam a uma decisão regulatória semelhante à que seria tomada com base nos métodos existentes.

As comparações entre as NAMs e os métodos existentes em animais de laboratório, quando apropriado, devem considerar a confiabilidade e reprodutibilidade dos métodos de ensaio em animais de referência, incluindo a compreensão das razões para a variação observada em ambos os tipos de métodos, se possível. Quando disponíveis, o uso de dados de referência da espécie de interesse permite a avaliação de uma NAM em relação à resposta relevante para a espécie. Se dados de curso de tempo *in vivo* estiverem disponíveis, NAMs, como sistemas microfisiológicos, podem ser usados para simular a toxicocinética e, em seguida, a extrapolação computacional do sistema microfisiológico pode ser comparada com os dados animais ou humanos. A modelagem farmacocinética com base fisiológica permite a estimativa das concentrações internas a partir de doses de referência e a comparação com as concentrações de atividade *in vitro*. Esses modelos também podem ser aplicados em uma abordagem de dosimetria reversa para realizar extrapolação *in vitro* para *in vivo* (IVIVE) e prever doses administradas equivalentes que resultariam em concentrações plasmáticas ou no tecido-alvo em que a bioatividade é observada na NAM. Quando os humanos são a espécie de interesse, evidências epidemiológicas, clínicas ou observacionais de alta qualidade dos efeitos podem ser úteis para fornecer informações sobre o desenvolvimento de confiança científica na NAM. No entanto, esses dados de referência

humanos raramente estão disponíveis para a maioria dos endpoints e produtos químicos, e as comparações geralmente devem se basear em dados de uma espécie diferente. Os dados de estudos com animais podem ser selecionados e comparados com listas de padrões de referência de produção com resultados reproduzíveis, robustos e relevantes. Em alguns contextos, como aplicações ecológicas, homologia de sequências de alvos moleculares ou conservação de mecanismos biológicos, pode ser útil favorecer uma comparação com dados derivados de diferentes espécies (Farmahin et al., 2013; LaLone et al., 2016).

Várias publicações avaliaram os resultados de métodos de ensaio de referência baseados em animais para diversos endpoints e mostraram que os resultados desses ensaios demonstram níveis variáveis de reprodutibilidade (Browne et al., 2018; Dumont et al., 2016; Karmaus et al., 2022; Kleinstreuer et al., 2018; Luechtefeld et al., 2016; Pham et al., 2020; Rooney et al., 2021). A variabilidade observada pode refletir fatores biológicos inerentes, erros de relato, diferenças de protocolo ou variações na pureza da substância de ensaio, por exemplo. Resultados conflitantes entre o método de ensaio em animais de referência e os dados da NAM devem ser explicados sempre que possível, incluindo referência à biologia da espécie de interesse. Isso é necessário para fornecer um contexto realista sobre a funcionalidade dos dados de animais de laboratório e, portanto, é necessário para definir expectativas apropriadas em torno da capacidade máxima de desempenho das NAMs que são comparadas com o método de ensaio de referência (Browne et al., 2019).

O valor relativo da comparação de NAMs com ensaios em animais antigos e a relevância biológica e mecanicista das NAMs para as espécies de interesse devem ser considerados com base na qualidade dos dados disponíveis. Realisticamente, em muitos casos, aqueles que buscam estabelecer confiança em uma NAM precisam considerar o uso histórico de estudos com animais e a exigência de comparação com os métodos existentes como uma importante linha de evidência. De acordo com muitos requisitos estatutários e regulamentares, as informações derivadas das NAMs não devem ser menos protetoras do que os métodos existentes. Idealmente, o método será mais preditivo e poderá permitir uma geração mais rápida e abrangente de dados relevantes sobre muitos produtos químicos, em que os dados poderiam ser escassos ou ausentes, gerando confiança entre entidades reguladoras e as comunidades de partes interessadas. Pode haver COUs específicos que permitam exceções a essa regra; no entanto, a aceitação dessas NAMs como métodos qualificados estará sujeita aos requisitos específicos da agência ou órgão regulador relevante. A extensão dessas comparações pode variar dependendo da quantidade e qualidade dos dados disponíveis e da profundidade da compreensão da relevância para a espécie de interesse, tanto da NAM quanto do método de referência. Quando o desempenho da NAM é avaliado com base no método de ensaio em animais de referência, a quantidade de variância aceitável na NAM deve ser considerada em relação à variância observada nos dados *in vivo* e com base no COU pretendido.

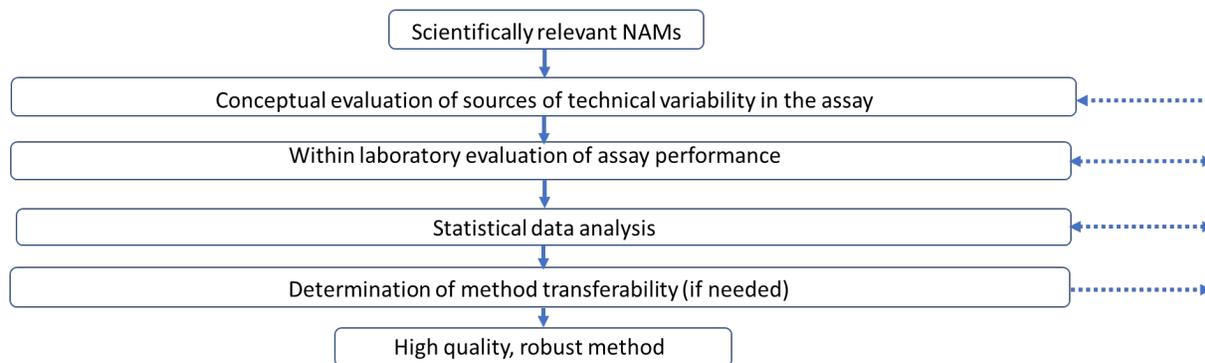
### 3.3 Caracterização técnica

A caracterização técnica é um componente-chave do desenvolvimento de NAMs para uso generalizado. Ela inclui uma avaliação das fontes de variabilidade na NAM, projetando o ensaio para incluir medidas de controle relevantes, avaliando a gama de substâncias de ensaio para as

quais o ensaio pode ser usado (ou seja, o domínio de aplicabilidade) e desenvolvendo uma abordagem adequada de análise de dados estatísticos. Um aspecto fundamental para demonstrar a validade científica de uma NAM é que o ensaio seja suficientemente bem caracterizado do ponto de vista técnico para garantir que seja robusto, confiável e reproduzível. A NAM inclui o próprio sistema de ensaio e o método de quantificação do endpoint.<sup>1</sup> Existem aspectos da caracterização técnica que se sobrepõem aos conceitos-chave anteriores, como relevância biológica, que fundamenta a seleção de compostos de referência para diferentes finalidades (Tabela 4). A avaliação do desempenho de uma NAM em relação a um conjunto bem definido de compostos de referência biológicos com bioatividades relevantes já foi apresentada (Seção 3.2.2); portanto, esta seção se concentrará em aspectos técnicos, como ferramentas de qualidade (Ishikawa, 1985), desenvolvimento de métodos, documentação e padrões.

### 3.3.1 Incorporação de ferramentas de qualidade selecionadas

Em geral, a caracterização técnica das NAMs se encaixa em uma estrutura com etapas abrangentes (Figura 2): 1) verificação inicial da relevância científica da NAM, 2) avaliação conceitual, 3) avaliação intralaboratorial, 4) análise e relatórios estatísticos de dados e 5) avaliação interlaboratorial (se necessário).<sup>1</sup> Os resultados das etapas 2 a 5 estão interrelacionados, de maneira que os resultados de cada etapa potencialmente afetam todas as outras. Por exemplo, os resultados dos testes interlaboratoriais podem revelar que testes intralaboratoriais adicionais devem ser realizados ou que o protocolo precisa ser revisado para incluir uma nova medição de controle.



**Figura 2.** Estrutura para o desenvolvimento de NAMs robustas. As linhas sólidas indicam etapas que devem ser tomadas na ordem sugerida. As linhas pontilhadas indicam uma direção que pode

<sup>1</sup> Pode haver exemplos de métodos para os quais a avaliação interlaboratorial não seja necessária ou não seja viável, como ensaios de triagem robotizados de alto rendimento em grande escala e abordagens *in silico* baseadas em aprendizado de máquina.

ser tomada, se necessário, para reavaliar qualquer uma das etapas anteriores. Adaptada e reproduzida com permissão de Petersen et al. (2022b).

A etapa inicial de verificação inclui uma avaliação da relevância biológica de um ensaio, seu potencial de COU e o potencial de atingir um nível suficiente de qualidade técnica. Se a NAM não tiver um COU claro ou relevância biológica, ou se tiver problemas significativos de qualidade técnica que talvez não possam ser resolvidos, a NAM poderá não ser adequada para uso regulatório. Na fase de avaliação conceitual, a NAM é revisada para avaliar as fontes esperadas de variabilidade e medidas de controle de projeto. Na avaliação intralaboratorial, experimentos podem ser realizados para avaliar a robustez do ensaio, estabelecer um intervalo típico para as medições de controle (por exemplo, controles negativos, de veículo e positivos) e identificar se há interações entre as medições de controle e o resultado do ensaio. As informações da avaliação conceitual e da avaliação intralaboratorial permitem o desenho de um modelo estatístico para avaliar o resultado médio do ensaio, caracterizar a variabilidade e estabelecer critérios para uma resposta positiva ou negativa e a confiança estatística para essa determinação.

Por fim, pode ser necessário que algumas NAMs sejam submetidas a uma avaliação de transferibilidade por meio de testes interlaboratoriais. Os testes interlaboratoriais podem revelar etapas em um protocolo que são interpretadas de forma diferente entre os laboratórios e revisões que podem ser feitas para melhorar a qualidade técnica da NAM. Os estudos de transferibilidade também podem identificar problemas decorrentes de diferenças na implementação técnica ou execução de um protocolo (por exemplo, pipetagem em um laboratório versus automação em outro) que exigem mudanças.

A Tabela 5 lista várias ferramentas de qualidade que podem ser úteis na caracterização técnica de uma NAM. Um tratamento mais detalhado desse tema está disponível em Petersen et al. (2022b). Algumas das informações geradas por essas ferramentas podem permanecer internas ao desenvolvedor do método de ensaio, enquanto outras informações podem ser solicitadas para corroborar a análise da agência.

**Tabela 5.** Ferramentas de qualidade frequentemente usadas na caracterização técnica de NAMs\*

<b>Ferramenta de qualidade</b>	<b>Descrição</b>	<b>Benefício/Utilidade</b>
Fluxogramas	Elaboração de diagramas para cada etapa em um protocolo.	Otimização da identificação e cobertura das etapas do protocolo que possam ser monitoradas por medidas de controle.

<b>Ferramenta de qualidade</b>	<b>Descrição</b>	<b>Benefício/Utilidade</b>
Análise de causa e efeito	Revisão da literatura e histórico do ensaio; elaboração de um diagrama de todas as fontes de variabilidade esperadas.	Identificação das principais fontes de variabilidade e aspectos de um método que possam ser difíceis de padronizar. Orientação de testes de robustez e seleção de medidas de controle.
Gráficos de controle	Medições de controle para avaliar o desempenho técnico, incluindo experimentos preliminares únicos, medições periódicas em uma frequência predeterminada e medições de controle internas do processo efetuadas sempre que o ensaio é realizado. Os gráficos de controle monitoram as medições de controle ao longo do tempo.	Teste de possíveis vieses, avaliação do desempenho e calibração do instrumento e medição das principais fontes de variabilidade ao longo do tempo e entre os experimentos.
Fichas de verificação	Registro dos principais dados, metadados e medidas de controle.	Monitoramento de medições de controle internas do processo e suporte à solução de problemas quando estes surgirem, suporte à análise de dados e reprodutibilidade.
Gráficos de dispersão	Faça um gráfico de todos os dados das medições de controle e dos resultados da substância de ensaio.	Avaliação da existência ou não de interação entre diferentes medições de controle internas do processo ou entre essas medições de controle e os resultados da substância de ensaio.

\*Detalhes e exemplos estão disponíveis no Apêndice B.

### 3.3.2 Melhores práticas para controle de qualidade

Esta seção descreve os fatores técnicos que as agências federais podem considerar como melhores práticas para a avaliação de NAMs, incluindo DAs e abordagens integradas de teste e avaliação (IATAs). Os fatores listados aqui podem ou não se aplicar a todas as NAMs. Além disso, outros fatores não listados na orientação, como informações adicionais ou testes, podem ser necessários para uma agência ao avaliar a NAM. Os desenvolvedores e/ou patrocinadores são

incentivados a se comunicar diretamente com a agência federal à qual pretendem enviar métodos ou dados para determinar fatores adicionais que possam ser necessários para a análise.

A submissão de uma NAM para avaliação regulatória deve incluir uma descrição de quaisquer estudos intralaboratoriais ou interlaboratoriais, se conduzidos. Deve indicar se a NAM foi comparada a um método de referência: outra NAM, dados de animais *in vivo* ou dados humanos. Informações sobre o método de referência usado para comparação (ou seja, conjunto de dados de referência) também podem ser necessárias durante a avaliação. A avaliação de uma NAM pode ser realizada por meio de vários processos diferentes e envolve a documentação, usando investigações laboratoriais específicas, da adequação e confiabilidade das características de desempenho de um método para as aplicações pretendidas. A aceitabilidade dos dados está diretamente relacionada aos critérios usados para avaliação do método.

Além de servir para documentar o desempenho e caracterizar a aplicabilidade da NAM, boas práticas científicas, técnicas e de qualidade garantem que o processo geral de avaliação seja eficiente e eficaz, levando a uma maior confiança no método proposto. Os desenvolvedores devem reter todas as informações necessárias para calibrar, operar e manter qualquer equipamento, como manuais de equipamentos e software, certificados e garantias de confirmação de qualidade e segurança, documentação de versões de software, algoritmos de modelagem, bancos de dados selecionados e conjuntos de treinamento. Os desenvolvedores também devem manter a documentação dos fornecedores de materiais, células e reagentes se essas informações forem relevantes para a avaliação de uma NAM (discutido em detalhes na Seção 3.3.3). Para obter mais detalhes sobre práticas de qualidade, procedimentos de equipamentos e documentação a ser conservada, consulte o Documento de Orientação da OCDE sobre Boas Práticas de Método In Vitro (GIVIMP; OECD, 2018). Um relatório de qualidade de instalação/qualidade de operação/qualidade de desempenho (IQ/OQ/PQ) para cada instrumento usado é recomendado e é necessário se os estudos se destinarem a ser compatíveis com as Boas Práticas de Laboratório (BPL).

### **3.3.2.1 Informações relevantes para métodos celulares/tissulares**

A documentação das origens das células e tecidos usados em qualquer método de ensaio deve ser mantida. Idealmente, as informações retidas para análise devem incluir (entre outras):

- Considerações éticas, legais e de segurança
- Espécie/cepa/sexo
- Informações demográficas (se relevantes)
- Fonte/fornecedor
- Número de doadores
- Órgão/tecido de origem
- Tipo(s) celular(es) isolado(s)
- Sequências de alvos moleculares projetados, quando aplicável
- Técnica e data de isolamento
- Classificação de biossegurança

- Identificação e autenticação da linha celular
- Teste sorológico para agentes infecciosos (por exemplo, teste de micoplasma)
- Número de passagens em cultura celular/duplicação da população
- Tempo de duplicação
- Estabilidade genética
- Informações sobre a expressão genética e proteica (se relevante)
- Pré-tratamento

Para obter informações mais detalhadas, consulte o GD on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (Pamies et al., 2022) e o documento OECD GIVIMP (OECD, 2018).

Deve ser fornecida documentação sobre a quarentena de novas células e tecidos em condições adequadas de armazenamento em laboratório antes do uso nos ensaios. Os ensaios que utilizam células ou tecidos vivos devem incluir um ensaio de viabilidade celular.

Registros e documentação do desempenho de todos os equipamentos de laboratório (leitores de placas, incubadoras, geladeiras/congeladores etc.) devem ser mantidos por todos os laboratórios participantes.

O registro de células em bancos de células pode ajudar na rastreabilidade e na disponibilidade de longo prazo. Os bancos de células devem incluir documentação da densidade celular e do número de passagem celular. Registros da preparação do reagente devem ser mantidos (por exemplo, usando fichas de verificação para rastrear qualquer reagente ou consumível usado). Isso também é relevante para métodos *in vitro* que não usem células/tecidos. Alguns exemplos são (entre outros):

- Fornecedor
- Número do catálogo
- Números de lote
- Datas de preparação
- Datas de validade
- Nome do analista

O patrocinador ou desenvolvedor do estudo deve fornecer todas as informações de segurança relacionadas ao método ou metodologia que está sendo desenvolvida, bem como todas as regulamentações relevantes para o uso, transporte e descarte de todos os materiais perigosos.

### 3.3.2.2 Avaliação do método analítico usado na NAM

O desenvolvedor deve fornecer dados que demonstrem com clareza que a substância detectada ou quantificada é o produto químico ou analito de interesse pretendido. A Tabela 6 lista e descreve as melhores práticas de controle de qualidade relacionadas aos métodos analíticos.

**Tabela 6.** Avaliação do método analítico\*

<b>Avaliação do método analítico</b>	<b>Descrição</b>	<b>Benefício/Utilidade</b>
Limites de detecção e quantificação	A menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser detectada ou quantificada de forma confiável acima do reagente em branco ou dentro da curva padrão. A maior concentração na curva padrão determina o limite superior de quantificação.	Estabelece o alcance de um método analítico.
Identificação de interferência	Identifica quando os componentes do método alteram falsamente o sinal detectado.	Determina se há interações entre os componentes do método e impede a emissão de relatórios de resultados artefatuais.
Avaliação da precisão analítica	Caracteriza a precisão do método analítico usado e de quaisquer outros testes de precisão, como aqueles que avaliam a variabilidade de desempenho quando diferentes equipes usam o método proposto ou quando uma instrumentação diferente é usada para o método. Isso pode ser avaliado por meio de estudos de comparação interlaboratoriais.	Gera confiança na confiabilidade do método analítico e avalia as fontes de variabilidade laboratorial.
Estabilidade de materiais usados em NAMs	A capacidade dos materiais usados na NAM (por exemplo, substâncias de ensaio, equipamento de teste, sistema de exposição, reagentes e analitos) de produzir resultados semelhantes e aceitáveis durante um período em um determinado ambiente.	Caracteriza os materiais do método e garante que dados confiáveis sejam obtidos de forma consistente para um método específico.

<b>Avaliação do método analítico</b>	<b>Descrição</b>	<b>Benefício/Utilidade</b>
Ensaio de robustez	Testa a capacidade de um método ser reproduzido sob diferentes condições ou circunstâncias sem a ocorrência de diferenças inesperadas nos resultados obtidos.	Determina a faixa de parâmetros em que o ensaio funciona de forma aceitável.
Análise de recuperação	Testa um método de extração comparando os resultados das amostras extraídas com os de amostras enriquecidas de uma matriz similar e/ou espaços em branco enriquecidos.	Verifica a eficiência e a reprodutibilidade de um método de extração.
Análise técnica do domínio de aplicabilidade	Obtém dados adequados do método de ensaio para produtos químicos e/ou produtos representativos daqueles que são relevantes para o COU específico para o qual o teste é proposto e descreve com clareza as propriedades físico-químicas do domínio de aplicabilidade.	Reduz a incerteza em relação ao desempenho do ensaio para uso com diferentes produtos químicos e/ou produtos e fornece métodos e critérios para determinar quando um produto químico está dentro do domínio de aplicabilidade.
Controle positivo	Identifica os compostos de controle positivo relevantes para o endpoint e dentro da janela de detecção do ensaio.	Fornecer uma base coerente e confiável para comparação dos resultados da substância de ensaio.
Padrões de referência para calibração de instrumentos	Usado para calibrar instrumentos usando padrões de calibração e/ou amostras de controle de qualidade.	Garante medições confiáveis e identifica possíveis fontes de incerteza.

<b>Avaliação do método analítico</b>	<b>Descrição</b>	<b>Benefício/Utilidade</b>
Especificações de configuração	Define especificações para medições de controle internas do processo com base nos resultados dos testes intralaboratoriais e/ou interlaboratoriais usando uma abordagem estatística.	Garante critérios suficientemente rigorosos para medições de controle, levando a resultados robustos da substância de ensaio e à ausência de viés.

\*Detalhes e exemplos estão disponíveis no Apêndice C.

### 3.3.2.3 Avaliação da exatidão e/ou concordância da NAM com os padrões de desempenho

A exatidão e a concordância são muito semelhantes em definição e geralmente são consideradas intercambiáveis, dependendo do contexto de um determinado documento ou trecho. A concordância geralmente é definida como a comparação de dois métodos ou ensaios com base nos resultados obtidos, enquanto a exatidão geralmente é definida como a comparação de um método ou teste com um método de referência ou resultado de teste. Uma avaliação de exatidão e/ou concordância costuma ser usada na avaliação estatística de métodos de ensaio e os respectivos dados. Nesse contexto, a exatidão é definida como a proporção de previsões corretas entre o número total de resultados. Outros parâmetros estatísticos usados ao discutir a exatidão ou concordância dos métodos incluem sensibilidade, especificidade, preditividade positiva e negativa e taxas de falsos positivos e falsos negativos.

Sempre que possível, padrões de desempenho bem definidos (por exemplo, um conjunto balanceado de substâncias de referência conhecidas por produzir resultados positivos e negativos) podem ser usados para verificar a resposta e a validade do método. Medidas quantitativas de concordância (ou seja, sensibilidade, especificidade, preditividade positiva e negativa, taxas de falsos positivos e negativos) devem ser relatadas. Ao comparar um método de ensaio proposto a um método com padrões de desempenho estabelecidos (por exemplo, métodos “me-too” para as diretrizes de teste da OCDE [TGs]) que produz dados funcionais e mecanicistas semelhantes, a concordância (incluindo dados discordantes) de ambos os métodos deve ser avaliada um em relação ao outro e em relação a um método de referência.

### 3.3.2.4 Procedimentos operacionais padrão e detalhes do método

Recomenda-se que o método de ensaio proposto tenha procedimentos operacionais padrão (SOPs) bem documentados para auxiliar no desempenho congruente do método e das atividades laboratoriais relacionadas, como manuseio do sistema de teste e calibração do equipamento. Os SOPs devem abranger todos os aspectos dos ensaios e análises. Os SOPs devem incluir:

- Sistemas de contabilização que garantam a integridade dos artigos de teste (por exemplo, manutenção de registros, segurança e custódia da cadeia de amostras).
- Preparação de amostras e ferramentas analíticas, como métodos, reagentes (incluindo, quando aplicável, o fabricante, número de catálogo, número do lote etc.), equipamentos e instrumentação.
- Procedimentos para controle de qualidade e verificação de resultados.
- Detalhes do método, incluindo descrição e formulação completas do produto, sistema de exposição, volume/peso/solubilidade/protocolo de dosagem da substância em estudo e faixa de exposição/dose apropriada.

A parte remetente também deve fornecer uma lista de características operacionais e critérios operacionais para avaliar o desempenho e os resultados do ensaio. As informações operacionais e os critérios dos sistemas técnicos que compõem a NAM podem variar, mas os critérios podem incluir gráficos de controle de qualidade ou outros padrões de desempenho para todos os controles, padrões, exposições (dose e duração) e grupos experimentais. Deve ser incluída uma descrição dos métodos estatísticos usados na avaliação dos dados. Além disso, os desenvolvedores devem descrever como a incerteza experimental, a incerteza estatística, a interferência e o histórico foram avaliados.

### 3.3.3 Documentação

Esta seção descreve as melhores práticas para a documentação de NAMs (incluindo DAs e IATAs). Os fatores listados aqui podem ou não se aplicar a todas as NAMs. Além disso, uma agência pode precisar de documentação adicional para avaliar a NAM. Os desenvolvedores e/ou patrocinadores são incentivados a se comunicar diretamente com a agência federal à qual pretendem enviar métodos ou dados para apurar fatores adicionais que possam ser necessários para a análise. Para algumas agências, uma revisão independente por pares da NAM e dos respectivos dados pode ser necessária antes da revisão da agência.

Para novos métodos, a documentação deve incluir uma descrição do método de ensaio proposto e como ele pode ser relevante para fins regulatórios ou se adequaria a um COU específico. As informações relevantes incluiriam (entre outras) qualquer informação mecanicista e a relevância biológica do método de ensaio e de qualquer COU proposto (por exemplo, aplicado à avaliação de risco). Os domínios de aplicabilidade humana ou de táxons apropriados devem ser incluídos na documentação. Outros aspectos importantes da documentação estão detalhados abaixo.

Recursos adicionais estão disponíveis para fornecer orientação sobre a documentação. Para métodos *in vitro*, os desenvolvedores podem consultar o documento GIVIMP da OCDE (OECD, 2018).

#### 3.3.3.1 Identidade e pureza da substância de ensaio

Para todas as substâncias testadas na NAM (por exemplo, controles, compostos de referência, outras substâncias de ensaio), deve-se relatar, no mínimo, a identidade da(s) substância(s), idealmente um identificador exclusivo (por exemplo, CASRN, SMILES, InchiKey) e

informações sobre a pureza da substância, conforme apresentadas pelo fornecedor. Se o laboratório tiver os recursos necessários, há um maior benefício em realizar medidas adicionais de controle de qualidade usando métodos analíticos para avaliar a pureza e a identidade da substância. A capacidade de coletar essas informações também pode depender do COU, pois algumas substâncias de ensaio (por exemplo, amostras ambientais que representam misturas complexas com composição desconhecida ou variável) podem não estar bem caracterizadas.

### 3.3.3.2 Desenvolvimento de métodos

Uma descrição específica, detalhada e escrita do método deve ser desenvolvida com base nos dados produzidos a partir desse método. Isso pode ser na forma de um protocolo, plano de estudo, relatório e/ou SOP. Cada etapa do método deve ser investigada para determinar até que ponto as variáveis ambientais, matriciais ou procedimentais podem afetar a detecção e/ou quantificação dos analitos.

Durante o desenvolvimento, muita atenção deve ser dada a fatores como:

- Seleção de reagentes (com relevância biológica, especificidade e estabilidade apropriadas).
- Método de detecção ou instrumentação (ou seja, procedimentos de desempenho e calibração prontamente disponíveis).
- Compatibilidade de descartáveis (ou seja, placas de microtitulação e outros plásticos) com as medições do ensaio e as substâncias de ensaio.
- Método de análise/método estatístico.
- Etapas ou processos que possam introduzir variabilidade do ensaio.

Medidas apropriadas devem ser tomadas para minimizar os efeitos externos ou de matriz (ou pelo menos caracterizar esses efeitos) durante a aplicação do método, especialmente se os compostos, matrizes ou equipamentos usados durante o desenvolvimento forem diferentes daqueles usados durante a caracterização técnica do método.

### 3.3.3.3 Medições de parâmetros e endpoints

As medições de cada endpoint ou analito devem ser bem testadas e documentadas. O desenvolvimento do método para uma nova NAM deve incluir a demonstração de que o método pode medir com sucesso todos os parâmetros relevantes. Os metadados relevantes de cada experimento devem ser coletados e registrados para vincular dados quantitativos a informações qualitativas, como condições experimentais ou substância química em estudo e concentração, e para rastrear fatores externos (como a data ou o técnico que conduz o experimento) que possam contribuir para a variação do ensaio ou os efeitos do lote. Esses dados e metadados devem ser exportados e salvos em um formato acessível para que possam ser mencionados durante revisões independentes da validação. Esse tema também é discutido nas seções do Apêndice B sobre gráficos de controle e fichas de verificação.

### 3.3.3.4 Limites de uso

Os pontos fortes e limitações específicos do método de ensaio devem ser claramente identificados e descritos. Todas as possíveis fontes de interferência devem ser listadas e quaisquer produtos químicos ou classes de produtos químicos com potencial para interferir no teste devem ser identificados. A documentação também deve identificar quaisquer limites conhecidos sobre quais materiais possam ser testados usando a NAM.

### 3.3.3.5 Endpoint bem definido

Os dados gerados pelo método de ensaio devem medir ou prever adequadamente o endpoint de interesse e esse endpoint deve ser definido com clareza com uma explicação da relevância biológica, como descrito na Seção 3.2. Um exemplo disso seria uma NAM que fornecesse informações sobre um evento-chave específico em uma AOP. Os dados também devem descrever qualquer relação entre o novo método de ensaio e um método de ensaio existente ou entre o novo método de ensaio e os efeitos nas espécies-alvo. Os critérios para um resultado positivo, negativo ou inconclusivo na NAM devem ser claramente definidos e avaliados ao longo do tempo para garantir a estabilidade do sistema.

### 3.3.3.6 Criação de um modelo estatístico

Modelos estatísticos podem ser criados usando-se dados dos testes intralaboratoriais. Esses modelos podem ser criados com abordagens estatísticas bayesianas ou frequentistas. Os histogramas podem ser usados para avaliar a distribuição dos dados obtidos para medições de controle internas do processo e para avaliar que tipo de distribuição (por exemplo, distribuição normal) se adequa aos dados (consulte Petersen et al., 2022b para obter detalhes). É útil desenvolver modelos para calcular a variabilidade cumulativa da NAM a partir de medições de substâncias de ensaio e medições de controles internos do processo, em vez de usar apenas dados sobre a variabilidade das substâncias de ensaio. Essas informações podem ser usadas para criar um modelo estatístico capaz de gerar uma decisão (por exemplo, a substância de ensaio é positiva ou negativa) e a confiança estatística para essa decisão. Uma simples comparação do valor médio de uma avaliação da substância em estudo com um limite não considera a variabilidade dos resultados do teste e não pode fornecer confiança estatística para a decisão.

Uma preocupação fundamental ao desenvolver modelos estatísticos para NAMs é como diferenciar resultados “negativos” e “fracamente positivos”. O limite para o modelo estatístico pode ser fundamentado por dados *in vivo* quando disponíveis (Friedman et al., 2023; Karmaus et al., 2022; Pham et al., 2020). Isso pode exigir testes repetidos de compostos “límitrofes” para avaliar a reprodutibilidade da NAM; consulte, por exemplo, a Diretriz 497 (OCDE, 2021a). Por exemplo, um modelo estatístico que avalia uma relação dose-resposta pode ser usado para avaliar o ponto de partida ou a concentração que causa um efeito definido (por exemplo, valor de EC<sub>50</sub>) e os intervalos de confiança baseados nos respectivos dados em torno desses valores. Também pode ser relevante avaliar a qualidade de uma NAM usando abordagens estatísticas, como teste T, fator Z ou outros critérios estatísticos apropriados (Zhang et al., 1999; Zhang, 2011).

### 3.3.3.7 Reprodutibilidade dos resultados do ensaio

A documentação de reprodutibilidade técnica deve ser incluída com as informações enviadas, quando aplicável. A reprodutibilidade do método pode ser avaliada por meio de medições replicadas, incluindo controles de qualidade e amostras. Essa avaliação deve incluir a discussão da justificativa para a seleção das substâncias usadas para avaliar a reprodutibilidade (possivelmente em quaisquer estudos intra e interlaboratoriais realizados) e até que ponto elas representam a gama de resultados de testes possíveis. Valores atípicos devem ser identificados e discutidos. Deve ser incluída uma análise estatística quantitativa da extensão de qualquer análise intra e/ou interlaboratorial de variabilidade ou coeficiente de variação. As medidas de tendência e variação centrais devem ser resumidas para dados históricos de controle (negativos, positivos e do veículo, quando aplicável). Ao testar os mesmos compostos várias vezes, as comparações podem ser quantitativas (por exemplo, valores de EC<sub>50</sub> obtidos) ou qualitativas (por exemplo, classificação de perigo). Nos casos em que o método de ensaio proposto seja semelhante a um método de ensaio consolidado de um ponto de vista mecanicista e funcional, com padrões de desempenho existentes (por exemplo, de um TG da OCDE), a confiabilidade dos dois métodos de ensaio deve ser comparada e o impacto potencial de quaisquer diferenças deve ser discutido.

### 3.3.3.8 Procedimento de interpretação de dados

O procedimento de interpretação dos dados, incluindo critérios para respostas positivas e negativas, deve ser descrito com clareza para cada NAM. A combinação de NAMs em DAs requer procedimentos fixos de interpretação de dados que sejam objetivos e não incluam o julgamento de especialistas, garantindo que resultem no mesmo desfecho quando aplicados por grupos diferentes (OCDE, 2017). O uso de algoritmos computacionais, por exemplo, modelos de aprendizado de máquina e software (incluindo o número da versão) deve ser bem documentado para garantir a reprodutibilidade das conclusões.

## 3.4 Integridade dos dados

A integridade dos dados é um aspecto fundamental para garantir que as informações derivadas das NAMs sejam confiáveis. Recomenda-se que os desenvolvedores de métodos conduzam uma avaliação interna dos processos usados para aquisição, transferência e processamento de dados brutos antes que esses dados sejam submetidos a partes externas e independentes para avaliação e revisão por pares para garantir a integridade dos dados e a credibilidade dos resultados. Os estudos devem ser conduzidos na medida do possível de acordo com os princípios de BPL ((21 CFR § 58; 40 CFR § 160; 40 CFR § 792; OCDE, 1998), quando necessário. Além disso, órgãos avaliadores, como o Centro Interinstitucional do Programa Nacional de Toxicologia para a Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos (NICEATM), podem facilitar as avaliações da qualidade e integridade do processo de desenvolvimento da NAM (NIEHS, 2023b). Outros recursos estão disponíveis para fornecer orientação sobre como maximizar a integridade dos dados. Para métodos *in vitro*, os desenvolvedores podem consultar o documento GIVIMP da OCDE (OECD, 2018). Para ferramentas digitais e gerenciamento de dados digitais, os desenvolvedores podem seguir os “Princípios orientadores da FAIR para gerenciamento e administração de dados científicos”, publicados em 2016 (Wilkinson et al., 2016).

### 3.5 Transparência das informações

A transparência facilita a confiança no uso de NAMs e, assim, acelera o ritmo do processo de tomada de decisão regulatória de uma agência e a possível aceitação ou qualificação regulatória. A relevância de uma NAM para a espécie, o COU e a caracterização técnica devem ser comunicados de forma transparente aos revisores por pares, à comunidade científica e ao público. Quando apropriado, artigos revisados por pares e informações que descrevam o COU, a relevância biológica e a caracterização técnica da NAM devem ser publicados em periódicos de acesso aberto e/ou resumidos em documentos regulatórios voltados para o público. Idealmente, os princípios da NAM, o protocolo, os arquivos de dados brutos e os scripts usados para analisar e representar graficamente os dados e os padrões de relatórios devem ser comunicados publicamente. Para NAMs que contenham propriedade intelectual, a OCDE fornece ferramentas para manter a transparência, incluindo termos razoáveis e não discriminatórios para compromissos de licenciamento (OCDE, 2021b). O uso de técnicas ou equipamentos proprietários ou patenteados em um método pode ser potencialmente usado para atender às necessidades de testes regulatórios. Para algumas agências, pode ser necessário que o desenvolvedor da NAM transmita informações privadas ou patenteadas para respaldar a aceitação ou qualificação regulatória; a orientação específica da agência pode orientar os desenvolvedores de métodos de ensaio sobre as necessidades de informação da agência.

Parceiros da Cooperação Internacional sobre Métodos de Ensaio Alternativos (ICATM; NIEHS, 2023c) publicam informações sobre avaliação de NAM e revisão por pares por meio do Sistema de Rastreamento de Métodos Alternativos para Aceitação Regulatória (TSAR) (EURL ECVAM, 2021). O TSAR indica os estágios alcançados pelas NAMs em termos de aceitação como um padrão reconhecido para uso em um contexto regulatório, juntamente com uma descrição resumida e protocolos ou SOPs aceitos. Quando disponível, o TSAR também inclui registros e documentos relevantes associados a uma NAM vinculados às diferentes etapas de todo o processo: submissão, validação, revisão por pares, recomendações e aceitação ou qualificação regulatória. A forma de interpretar os dados gerados por uma NAM e os respectivos critérios de aceitação devem ser comunicados de forma clara para que os usuários finais entendam o processo e possam aplicá-lo em um ambiente prático.

### 3.6 Revisão independente

As informações e dados que fundamentam o COU, a relevância biológica e a caracterização técnica da NAM podem ser revisados cientificamente por terceiros independentes (cujos membros não tenham conflitos de interesse); no entanto, o nível necessário de revisão dependerá dos regulamentos e políticas de cada agência.

A avaliação de uma NAM pode ser realizada por meio de vários processos diferentes e envolve a documentação das características de desempenho de um método para determinar se elas são adequadas e confiáveis para as aplicações pretendidas. A confiabilidade de um método geralmente inclui (mas sem limitação) reprodutibilidade, repetibilidade e robustez. No entanto, pode haver informações adicionais não listadas neste relatório que podem ser necessárias para a revisão de alguns métodos. Além do desempenho e da aplicabilidade da NAM, boas práticas

científicas, técnicas e de qualidade garantem que o processo de revisão independente seja eficiente e eficaz e leve a uma maior confiança no método proposto. Os laboratórios devem reter todas as informações relevantes para a avaliação de uma NAM, como as informações necessárias para operar e manter o equipamento usado na condução de uma NAM (por exemplo, manuais de equipamentos e software e certificados de conformação de qualidade e segurança), bem como documentação de fornecedores de materiais, células e reagentes. Para estudos destinados a serem compatíveis com BPL, um relatório de IQ/OQ/PQ para cada instrumento usado também pode ser relevante. Para estudos que não sejam de BPL, deve-se guardar a documentação da instalação e de testes adequados para mostrar que o equipamento funciona conforme o esperado.

Os dados brutos e as informações que descrevem a NAM devem estar acessíveis para análise por terceiros independentes e/ou tomadores de decisão de agências reguladoras. A avaliação e a revisão independente por pares das NAMs podem ser organizadas por órgãos de validação, como o NICEATM, o Laboratório de Referência da União Europeia para Alternativas a Testes em Animais (EURL ECVAM) e seu Comitê Consultivo Científico e o Centro Japonês para a Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM). Outros órgãos ou organizações internacionais que podem revisar as NAMs de forma independente são o Painel Consultivo Científico da Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas dos EUA, o Comitê Científico da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar e a OCDE. Como alternativa, o desenvolvedor pode financiar (mas não liderar diretamente o gerenciamento) de uma revisão independente do método. As publicações revisadas por pares são úteis para compartilhar informações de ensaios com a comunidade científica e podem complementar uma revisão mais formal por terceiros independentes para respaldar a aceitação e o uso do método em um contexto regulatório.

A extensão da revisão independente variará dependendo do COU, da estrutura regulatória e do método específico que estiver sendo avaliado. Algumas das informações enviadas pelo desenvolvedor para revisão independente incluiriam registros de quaisquer estudos intra ou interlaboratoriais, inclusive se a NAM foi comparada a outra NAM, a dados *in vivo* de animais ou de humanos. Essas avaliações podem auxiliar na transferibilidade interlaboratorial da NAM.

## **4.0 Aceitação de NAMs pela Agência Federal dos EUA**

### **4.1 Compreensão das necessidades regulatórias e contextos de decisão**

As agências federais têm autoridades diferentes para solicitar, obter e usar dados toxicológicos. Eles diferem de acordo com o estatuto, os regulamentos e a categoria do produto. Uma NAM pode ser útil e adequada em alguns contextos estatutários ou regulatórios, mas não em outros. Consequentemente, desenvolvedores e usuários de uma NAM devem considerar o contexto no qual ela será usada. Alguns contextos possíveis incluiriam, entre outros, DAs, IATAs ou métodos autônomos.

A possibilidade de uma NAM ser aceitável para uma finalidade regulatória ou outra finalidade depende da natureza da decisão a ser tomada, da adequação da NAM para o uso pretendido e do quanto a submissão regulatória depende dos resultados da NAM para corroborar a determinação

de segurança, eficácia e/ou risco. Uma NAM com alta sensibilidade e baixa especificidade que identifique um sinal de preocupação pode ser útil para aplicações nas quais um grande número de compostos seja examinado para priorizar avaliações adicionais. Essa NAM pode ter utilidade limitada ao se decidir qual dose de um único composto é segura para exposição. Em alguns casos, as agências podem procurar sinais de preocupação em situações de falta de dados (identificação de perigos). Em outros casos, as agências podem precisar tomar decisões mais quantitativas sobre compostos (avaliação de risco) e podem não estar dispostas a aceitar um alto nível de incerteza nos resultados das NAMs usadas para fundamentar essas decisões. A implementação das características de desempenho deve refletir como a NAM será usada e individualizada para cada NAM e seu COU.

Para facilitar esse processo, algumas agências podem querer avaliar as NAMs antes de usá-las em um processo de tomada de decisão regulatória. A avaliação provavelmente se concentrará na NAM com um COU bem definido. Um dos propósitos da avaliação é permitir que os reguladores apliquem os resultados gerados usando a NAM sem precisar revisar novamente todos os dados de suporte subjacentes à NAM (consulte os documentos citados na Tabela 1).

#### **4.2 Considerações sobre o contexto de uso**

O propósito da NAM deve ser comunicado com clareza (por exemplo, identificação de perigos, avaliação de potência, ponto de partida para avaliação quantitativa de riscos etc.) e a NAM deve ser avaliada com base nessa finalidade. É apropriado focar a aplicação de uma NAM recém-desenvolvida em um único COU. No entanto, COUs adicionais podem ser adicionados posteriormente com os devidos dados de suporte. Um COU geralmente precisa se concentrar em uma necessidade regulatória específica. As iniciativas iniciais para qualificar uma NAM podem ser mais bem-sucedidas se o COU for restrito. Um COU pode ser expandido com dados adicionais, conforme apropriado. As necessidades regulatórias diferem entre as agências, portanto, um COU para uma determinada NAM também pode ser diferente. É essencial estabelecer um COU apropriado para uma NAM proposta antes de realizar uma iniciativa completa de qualificação.

A determinação de um COU apropriado geralmente deve ser discutida entre o desenvolvedor da NAM e a(s) agência(s) para a(s) qual(is) o COU é relevante. Várias iterações de um COU podem ser necessárias antes que uma versão aceitável seja definida. Um COU pode até mesmo mudar durante a coleta de dados, à medida que a aplicabilidade e as limitações de uma NAM são definidas com mais detalhes.

#### **4.3 Evolução da confiança com base na experiência adquirida**

A incorporação de uma NAM no uso regulatório requer confiança suficiente no método por parte dos reguladores e do setor regulamentado. A validação e a qualificação corroboram essa confiança, mas podem não ser suficientes para garantir a implementação. A educação e a experiência com uma NAM geralmente são necessárias antes que uma NAM tenha ampla aceitação para sua finalidade. Custo, complexidade, disponibilidade de reagentes e equipe

treinada na condução e interpretação de uma NAM são alguns fatores que podem limitar a adoção de uma NAM, mesmo que dados de validação e qualificação estejam disponíveis.

O desempenho de uma NAM destinada a complementar ou substituir uma abordagem existente geralmente precisará ser comparada com a abordagem existente. Frequentemente, há grande confiança nas abordagens existentes com as quais exista uma experiência considerável. Essas abordagens existentes podem não ter sido submetidas a validação formal, mas o uso repetido e bem-sucedido da abordagem existente, além da suposta validade inerente dos testes em animais, geralmente cria uma confiança considerável na abordagem. Os usuários precisam saber se uma NAM será tão boa ou melhor do que as abordagens existentes ao usar os resultados para tomar decisões sobre segurança. Níveis variáveis de incerteza podem ser aceitáveis para diferentes COUs, com a necessidade de aumentar a confiança à medida que se avança na priorização e na triagem, na caracterização de perigos e na avaliação de riscos, por exemplo.

Um mecanismo para criar confiança em uma NAM consiste no fornecimento de dados de uma NAM pelos usuários em paralelo com os dados do método existente que a NAM pretende substituir ou complementar. O compartilhamento voluntário de informações sobre NAMs dentro e entre setores pode ajudar a estabelecer um corpo de dados suficientemente grande para fomentar a confiança nos métodos. Com o tempo, as agências e o setor poderão ver de que modo a NAM pode se adequar aos paradigmas de avaliação existentes sem comprometer os padrões de segurança.

## **5.0 Harmonização internacional e dos EUA**

A coordenação entre as agências federais dos EUA e, de forma mais ampla, com as autoridades reguladoras internacionais ajudará a garantir a harmonização das abordagens para validar as NAMs e corroborar sua aplicação e implementação. O ICCVAM e o NICEATM desempenham papéis importantes na viabilização da comunicação e colaboração, tanto nacional quanto globalmente.

### **5.1 Harmonização dos EUA: papel do ICCVAM e do NICEATM**

A Lei de Autorização do ICCVAM descreve os seguintes propósitos do ICCVAM (42 U.S.C 2851-3, 2000; NIEHS, 2023d):

- Aumentar a eficiência e a eficácia da revisão do método de ensaio da agência federal dos EUA.
- Eliminar a duplicação desnecessária de iniciativas e compartilhar experiências entre as agências reguladoras federais dos EUA.
  - Isso é feito por meio de vários meios, como reuniões mensais, grupos de trabalho, reuniões públicas abertas (Fórum Público) e grupos consultivos científicos (Comitê Consultivo Científico sobre Métodos Toxicológicos Alternativos).
- Otimizar a utilização do conhecimento científico fora do governo federal dos EUA.

- Isso geralmente é feito por meio da organização de reuniões e workshops com parceiros do ICATM, bem como com vários cientistas em conferências.
- Garantir que os métodos de ensaio novos e revisados sejam validados para atender às necessidades das agências federais dos EUA.
  - Cientistas e reguladores de agências federais cooperam com os desenvolvedores para garantir que os métodos produzidos atendam a uma necessidade regulatória.
- Reduzir, refinar ou substituir o uso de animais em testes, sempre que possível.

O ICCVAM facilita colaborações interagências e internacionais que promovem o desenvolvimento, a aceitação ou qualificação regulatória e o uso de testes alternativos que incentivam a redução, o refinamento ou a substituição de métodos de ensaio em animais. O ICCVAM fornece orientação aos desenvolvedores de métodos de ensaio, avalia recomendações de avaliações de especialistas sobre métodos alternativos de ensaios toxicológicos e faz recomendações sobre o uso de métodos de ensaio revisados às agências federais apropriadas. O ICCVAM cumpre suas funções por meio de grupos de trabalho técnicos ad hoc, gerenciados pelo NICEATM, para realizar tarefas específicas importantes para o desenvolvimento ou validação de alternativas aos testes em animais. Um desses exemplos contínuos é o apoio do ICCVAM na coordenação de um estudo de pré-validação interlaboratorial para uma NAM desenvolvida pela EPA com base em um ensaio *in vitro* de microtecido tireoidiano humano para triagem química (Deisenroth et al., 2020).

O NICEATM, um escritório da Divisão de Toxicologia Translacional do Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental (NIEHS), fornece suporte técnico, científico e operacional para atividades de grupos de trabalho do ICCVAM e ICCVAM, painéis de revisão por pares, painéis de especialistas, workshops e iniciativas de validação. Além de apoiar o ICCVAM, o NICEATM:

- Realiza análises e avaliações de métodos de ensaio e coordena estudos de validação independentes sobre abordagens de ensaios alternativas novas e de alta prioridade.
- Fornece informações para desenvolvedores de métodos de ensaio, reguladores e indústria regulamentada por meio do site do NICEATM, do Ambiente Químico Integrado (Integrated Chemical Environment) e de workshops sobre temas de interesse.
- Apoia as atividades da Divisão de Toxicologia Translacional do NIEHS, especialmente aquelas que contribuem para o consórcio interinstitucional Toxicologia no Século 21 (Tox21) do governo dos EUA.

O fórum de comunicação interinstitucional fornecido pelo ICCVAM e o auxílio fornecido pelo NICEATM servem para garantir que recursos limitados sejam aproveitados de forma eficaz para coordenar as iniciativas das agências federais dos EUA para validar e qualificar as NAMs para aplicação regulatória.

## 5.2 Harmonização dos EUA: colaborações federais adicionais para promover os 3Rs

As agências federais dos EUA colaboram nas NAMs de várias maneiras, além de sua participação no ICCVAM. Por exemplo, Tox21 (Tox21, n.d.) é uma colaboração federal entre a

EPA, a Divisão de Toxicologia Translacional do NIEHS, o Centro Nacional para o Avanço das Ciências Translacionais (NCATS) dentro dos Institutos Nacionais de Saúde e a FDA. O objetivo do Tox21 é desenvolver melhores métodos de avaliação de toxicidade para testar com eficiência se certos compostos químicos podem ter o potencial de interromper os processos biológicos no corpo humano e causar efeitos negativos à saúde. A Tox21 produziu uma série de publicações e análises seminais que foram colocadas em uso regulatório, por exemplo, no Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos da EPA (Harmonização) (EPA, 2023). O NICEATM e a EPA também trabalharam em estreita colaboração em vários estudos para reduzir ou substituir o uso de animais em testes regulatórios. Isso inclui análises retrospectivas para eliminar o uso de animais para: 1) toxicidade aguda dérmica para pesticidas e formulações de pesticidas (EPA, 2020); 2) determinar se o uso de dados *in vitro* por si só será suficiente para a derivação do fator de absorção dérmica para avaliação do risco de pesticidas à saúde humana (Allen et al., 2021); e 3) determinar se o mesmo nível de proteção de vertebrados aquáticos não alvo pode ser alcançado com testes de toxicidade aguda *in vivo* em menos de três espécies de peixes (Ceger et al., 2023). A FDA também colabora com o NCATS para desenvolver ainda mais tecnologias de sistemas microfisiológicos para promover seu avanço e acelerar o uso translacional (FDA, 2023).

### 5.3 Harmonização internacional

Além das iniciativas colaborativas internacionais viabilizadas pelo ICCVAM, as agências dos EUA colaboram internacionalmente de forma independente para promover a aceitação das NAMs. Os exemplos incluem o ICATM, o envolvimento dos EUA com o subcomitê de especialistas das Nações Unidas sobre o Sistema Globalmente Harmonizado para Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), o envolvimento com o ICH para desenvolver diretrizes descrevendo o uso de NAMs e a participação no Programa de Diretrizes de Teste da OCDE e no Grupo de Trabalho sobre Avaliação de Perigos.

O ICATM foi estabelecido como uma parceria entre organizações de validação dos EUA (ICCVAM), Japão (JaCVAM), União Europeia (EURL ECVAM) e Canadá (Environmental Health Science and Research Bureau da Health Canada). Outras organizações participantes incluem o Centro Coreano para a Validação de Métodos Alternativos, o Centro Brasileiro para a Validação de Métodos Alternativos e a Administração Chinesa de Alimentos e Medicamentos e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças de Guangdong. Os objetivos gerais desse grupo foram:

- Estabelecer cooperação internacional nas áreas críticas de estudos de validação, revisão independente por pares e desenvolvimento de recomendações harmonizadas para garantir que métodos/estratégias alternativos sejam mais facilmente aceitos em todo o mundo.
- Estabelecer a cooperação internacional necessária para garantir que novos métodos/estratégias de ensaio alternativos adotados para uso regulatório forneçam proteção equivalente ou aprimorada para pessoas, animais e meio ambiente, ao mesmo tempo em que substituem, reduzem ou refinam (causando menos dor e sofrimento) o uso de animais sempre que cientificamente viável.

Nas Nações Unidas, o subcomitê do GHS estabeleceu um grupo de trabalho para atualizar vários capítulos do GHS para estabelecer critérios específicos para o uso de NAMs em várias classes de risco (por exemplo, irritação/corrosão da pele, irritação ocular/lesões oculares graves, sensibilização da pele). Essas iniciativas têm sido frutíferas no avanço das NAMs em nível internacional e estabeleceram os DAs como métodos aceitáveis para determinações de riscos. Esses esforços internacionais são importantes não apenas para promover as NAMs, mas também para fornecer experiência para regiões internacionais que podem não ter recursos suficientes nessa área.

O valor de harmonizar abordagens para o uso de NAMs também é ilustrado nas atividades do ICH. Várias diretrizes desenvolvidas pelo ICH descrevem o uso de métodos alternativos que são considerados abordagens aceitáveis por várias autoridades regulatórias e grupos do setor em todo o mundo. Esses métodos foram avaliados por grupos de trabalho de especialistas dentro do processo do ICH e incorporados às diretrizes quando apropriado. Os exemplos incluem o uso de métodos *in chemico* e *in vitro* para a avaliação da fototoxicidade (ICH, 2013). Além disso, a orientação do ICH sobre toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento inclui alguns contextos de uso para ensaios alternativos, bem como recomendações sobre a abordagem para qualificar tais ensaios e uma lista de compostos biológicos de referência (FDA, 2021b).

A OCDE é um fórum internacional para harmonizar diretrizes de testes regulatórios e documentos de orientação e está cada vez mais focada na validação e no uso de NAMs. O ICCVAM desempenha um papel importante na coordenação e contribuição para a posição dos EUA no Programa de Diretrizes de Testes de Efeitos na Saúde da OCDE. O Coordenador Nacional dos EUA representa os Estados Unidos na reunião anual do Grupo de Trabalho dos Coordenadores Nacionais e em outras atividades de desenvolvimento de diretrizes de teste. Nessa função, o Coordenador Nacional dos EUA solicita contribuições de agências relevantes do ICCVAM para atividades de TG da OCDE que envolvam qualquer aspecto dos 3Rs. Especialistas no assunto das agências do ICCVAM atuam em vários grupos de especialistas da OCDE para fornecer orientação científica sobre o desenvolvimento de produtos da OCDE, como diretrizes de teste, DAs e documentos de orientação. As diretrizes de teste da OCDE são usadas pelas partes interessadas dos 38 países membros da OCDE para avaliar a segurança química. A cláusula de aceitação mútua de dados da OCDE garante que os dados de segurança gerados usando uma diretriz de teste da OCDE sejam aceitos por todos os países membros, evitando testes redundantes. As agências do ICCVAM também contribuem para o Projeto de Estudos de Caso da OCDE IATA, que permite que os países compartilhem e colaborem no uso de novas metodologias na IATA para avaliar a segurança química dentro de um contexto regulatório.

## 6.0 Comunicação e treinamento para incentivar o uso de NAMs

A comunicação das agências sobre a aceitabilidade de NAMs específicos e o treinamento sobre NAMs podem facilitar seu uso. Quando apropriado e viável, as agências podem comunicar publicamente quando e como uma NAM é aceitável, dependendo das regras e políticas específicas da agência. Por exemplo, as NAMs podem ser descritas em GDs ou em sites

disponíveis publicamente. As agências reguladoras podem usar os programas de treinamento existentes ou implementar novos programas para a equipe e fornecer treinamento disponível ao público, quando possível, para novos métodos. O desenvolvimento de confiança em novas abordagens pode começar mesmo antes de uma NAM ser validada ou qualificada por meio do ensino da comunidade científica. Essas iniciativas iniciais de ensino podem se concentrar na ciência básica das novas abordagens. À medida que as abordagens amadurecem e os dados que sustentam a validade de uma abordagem se acumulam, as iniciativas educacionais podem mudar para familiarizar a comunidade com esses dados. O treinamento sobre uso e interpretação específicos de NAMs pode ocorrer quando as NAMs tiverem sido avaliadas para COUs específicos. Entidades como OCDE, ICCVAM e outras organizações de validação e sociedades científicas também podem fornecer treinamento e acesso a informações sobre NAMs que fundamentarão a confiança em seu uso.

A interação entre desenvolvedores de NAM, usuários do setor e reguladores pode facilitar o desenvolvimento e a adoção de métodos. Essas interações podem ocorrer por meio da participação de todas as partes em reuniões científicas, nas quais tais métodos são discutidos, e por meio de interações regulatórias mais formais de acordo com os processos específicos da agência. Como observado acima, o desenvolvimento de COUs e conjuntos de dados de qualificação apropriados pode ser um processo iterativo. Os COUs e os domínios de aplicabilidade podem mudar durante o desenvolvimento e a exploração de uma NAM à medida que os dados se acumulam. A comunicação contínua entre todas as partes durante esse processo pode ajudar a garantir que um caminho apropriado para a aceitação de uma NAM seja seguido.

Mesmo que uma NAM esteja disponível para um endpoint e seja aceita por uma agência reguladora, o patrocinador de uma aplicação pode optar por usar outras abordagens, como um ensaio em animais tradicional e, portanto, a NAM nem sempre pode ser enviada em uma solicitação regulatória. Pode haver vários motivos para isso que estão além do controle das autoridades reguladoras. Embora uma agência reguladora possa sugerir ou recomendar a substituição de um ensaio tradicional por uma NAM ou várias NAMs, o patrocinador de um composto nem sempre é obrigado a seguir a sugestão. O ensino e a familiaridade com NAMs entre todas as partes interessadas são necessários para gerar confiança suficiente para a adoção da NAM.

## **7.0 Conclusão e implementação**

Este relatório tem como objetivo auxiliar desenvolvedores de métodos, partes interessadas de setores regulamentados e agências federais no desenvolvimento, validação, qualificação e aceitação de NAMs cientificamente relevantes. Aqui, descrevemos os principais conceitos que devem ser considerados para permitir o desenvolvimento eficiente e oportuno de NAMs que sejam adequadas à finalidade, confiáveis e forneçam informações relevantes para a espécie de interesse. Todas as informações podem se aplicar ou não a um determinado método, DA ou IATA. Também pode haver outros conceitos que se aplicam a um método, DA ou IATA que não são discutidos neste relatório. É importante que os desenvolvedores trabalhem em estreita

colaboração com agências federais e usuários finais visando o uso pretendido da NAM, especialmente para aplicações de avaliação de risco em uma revisão regulatória. Estabelecer confiança científica nas NAMs e validar ou qualificar métodos para finalidades específicas e COUs devem ser processos iterativos que evoluem por meio da comunicação multidirecional entre as partes interessadas.

O campo das NAMs está em evolução, e podem surgir novas considerações sobre validação e qualificação de NAM que não foram previstas no momento da redação deste relatório. Como consequência, as partes interessadas envolvidas no desenvolvimento, validação e qualificação da NAM podem precisar permanecer flexíveis e abertas à incorporação de considerações não descritas aqui. Este relatório será atualizado regularmente e conforme a necessidade.

## Referências

- 15 USC §2601, 2016. 15 USC §2601: Findings, policy, and intent [WWW Document]. URL [https://uscode.house.gov/view.xhtml?req=\(title:15%20section:2601%20edition:prelim\)](https://uscode.house.gov/view.xhtml?req=(title:15%20section:2601%20edition:prelim)) (accessed 11.2.22).
- 21 CFR § 58, n.d. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 [WWW Document]. URL <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58> (accessed 11.3.22).
- 40 CFR § 160, n.d. CFR - Code of Federal Regulations Title 40 [WWW Document]. URL <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-160> (accessed 5.9.23).
- 40 CFR § 792, n.d. CFR - Code of Federal Regulations Title 40 [WWW Document]. URL <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-R/part-792> (accessed 5.9.23).
- 42 U.S.C 2851-3, 2000. ICCVAM Authorization Act of 2000 [WWW Document]. 42 U.S.C. 2851-3 Public Law 106-545. URL <https://www.congress.gov/bill/106th-congress/house-bill/4281/text> (accessed 5.9.23).
- Allen, D.G., Rooney, J., Kleinstreuer, N., Lowit, A., Perron, M., 2021. Retrospective analysis of dermal absorption triple pack data. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 38, 463–476. <https://doi.org/10.14573/altex.2101121>
- Browne, P., Delrue, N., Gourmelon, A., 2019. Regulatory use and acceptance of alternative methods for chemical hazard identification. *Current Opinion in Toxicology* 15, 18–25.
- Browne, P., Kleinstreuer, N.C., Ceger, P., Deisenroth, C., Baker, N., Markey, K., Thomas, R.S., Judson, R.J., Casey, W., 2018. Development of a curated Hershberger database. *Reproductive Toxicology* 81, 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.08.016>

- Ceger, P., Allen, D., Blankinship, A., Choksi, N., Daniel, A., Eckel, W.P., Hamm, J., Harwood, D.E., Johnson, T., Kleinstreuer, N., Sprankle, C.S., Truax, J., Lowit, M., 2023. Evaluation of the fish acute toxicity test for pesticide registration. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 139, 105340. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105340>
- Ceger, P., Garcia-Reyero Vinas, N., Allen, D., Arnold, E., Bloom, R., Brennan, J.C., Clarke, C., Eisenreich, K., Fay, K., Hamm, J., Henry, P.F.P., Horak, K., Hunter, W., Judkins, D., Klein, P., Kleinstreuer, N., Koehn, K., LaLone, C.A., Laurenson, J.P., Leet, J.K., Lowit, A., Lynn, S.G., Norberg-King, T., Perkins, E.J., Petersen, E.J., Rattner, B.A., Sprankle, C.S., Steeger, T., Warren, J.E., Winfield, S., Odenkirchen, E., 2022. Current ecotoxicity testing needs among selected U.S. federal agencies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 133, 105195. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105195>
- Chang, X., Tan, Y.-M., Allen, D.G., Bell, S., Brown, P.C., Browning, L., Ceger, P., Gearhart, J., Hakkinen, P.J., Kabadi, S.V., Kleinstreuer, N.C., Lumen, A., Matheson, J., Paini, A., Pangburn, H.A., Petersen, E.J., Reinke, E.N., Ribeiro, A.J.S., Sipes, N., Sweeney, L.M., Wambaugh, J.F., Wange, R., Wetmore, B.A., Mumtaz, M., 2022. IVIVE: Facilitating the use of in vitro toxicity data in risk assessment and decision making. *Toxics* 10, 232. <https://doi.org/10.3390/toxics10050232>
- Chiu, W.A., Wright, F.A., Rusyn, I., 2017. A tiered, Bayesian approach to estimating of population variability for regulatory decision-making. *ALTEX* 34, 377–388. <https://doi.org/10.14573/altex.1608251>
- Choksi, N.Y., Truax, J., Layton, A., Matheson, J., Mattie, D., Varney, T., Tao, J., Yozzo, K., McDougal, A.J., Merrill, J., Lowther, D., Barroso, J., Linke, B., Casey, W., Allen, D., 2019. United States regulatory requirements for skin and eye irritation testing. *Cutan Ocul Toxicol* 38, 141–155. <https://doi.org/10.1080/15569527.2018.1540494>
- Church, R.J., Gatti, D.M., Urban, T.J., Long, N., Yang, X., Shi, Q., Eaddy, J.S., Mosedale, M., Ballard, S., Churchill, G.A., Navarro, V., Watkins, P.B., Threadgill, D.W., Harrill, A.H., 2015. Sensitivity to hepatotoxicity due to epigallocatechin gallate is affected by genetic background in diversity outbred mice. *Food Chem Toxicol* 76, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.008>
- Clippinger, A.J., Raabe, H.A., Allen, D.G., Choksi, N.Y., van der Zalm, A.J., Kleinstreuer, N.C., Barroso, J., Lowit, A.B., 2021. Human-relevant approaches to assess eye corrosion/irritation potential of agrochemical formulations. *Cutan Ocul Toxicol* 40, 145–167. <https://doi.org/10.1080/15569527.2021.1910291>
- Corley, R.A., Kuprat, A.P., Suffield, S.R., Kabilan, S., Hinderliter, P.M., Yugulis, K., Ramanarayanan, T.S., 2021. New approach methodology for assessing inhalation risks of a contact respiratory cytotoxicant: computational fluid dynamics-based aerosol dosimetry modeling for cross-species and in vitro comparisons. *Toxicological Sciences* 182, 243–259. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab062>

- CPSC, 2020. Proposed Guidance for Industry and Test Method Developers: CPSC Staff Evaluation of Alternative Test Methods and Integrated Testing Approaches and Data Generated from Such Methods to Support FHSA Labeling Requirements [WWW Document]. URL <https://www.regulations.gov/document/CPSC-2021-0006-0001> (accessed 5.4.22).
- CPSC, 2012. Recommended Procedures Regarding the CPSC's Policy on Animal Testing [WWW Document]. URL <https://www.cpsc.gov/Business--Manufacturing/Testing-Certification/Recommended-Procedures-Regarding-the-CPSCs-Policy-on-Animal-Testing> (accessed 5.4.22).
- Crofton, K.M., Mundy, W.R., 2021. External Scientific Report on the Interpretation of Data from the Developmental Neurotoxicity In Vitro Testing Assays for Use in Integrated Approaches for Testing and Assessment. EFSA Supporting Publications 18, 6924E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2021.EN-6924>
- Daniel, A.B., Strickland, J., Allen, D., Casati, S., Zuang, V., Barroso, J., Whelan, M., Régimbald-Krnel, M.J., Kojima, H., Nishikawa, A., Park, H.-K., Lee, J.K., Kim, T.S., Delgado, I., Rios, L., Yang, Y., Wang, G., Kleinstreuer, N., 2018. International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regul Toxicol Pharmacol* 95, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.03.003>
- Deisenroth, C., Soldatow, V.Y., Ford, J., Stewart, W., Brinkman, C., LeCluyse, E.L., MacMillan, D.K., Thomas, R.S., 2020. Development of an *In Vitro* Human Thyroid Microtissue Model for Chemical Screening. *Toxicological Sciences* 174, 63–78. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz238>
- Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R., 2016. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 36, 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
- Elliott, J.T., Rösslein, M., Song, N.W., Toman, B., Ovaskainen, A.K.-, Maniratanachote, R., Salit, M.L., Petersen, E.J., Sequeira, F., Romsos, E., Kim, S.J., Lee, J., Moos, N.R. von, Rossi, F., Hirsch, C., Krug, H.F., Suchaoin, W., Wick, P., 2017. Toward achieving harmonization in a nanocytotoxicity assay measurement through an interlaboratory comparison study. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 34, 201–218. <https://doi.org/10.14573/altex.1605021>
- EPA, 2023. Availability of New Approach Methodologies (NAMs) in the Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) [WWW Document]. URL <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2021-0756-0002> (accessed 2.20.23).
- EPA, 2021a. EPA New Approach Methods Work Plan [WWW Document]. URL [https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-11/nams-work-plan\\_11\\_15\\_21\\_508-tagged.pdf](https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-11/nams-work-plan_11_15_21_508-tagged.pdf) (accessed 5.5.22).

- EPA, 2021b. EPA Strategic Plan to Reduce the Use of Vertebrate Animals in Chemical Testing [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/strategic-plan-reduce-use-vertebrate-animals-chemical> (accessed 5.5.22).
- EPA, 2021c. Chlorothalonil: Revised Human Health Draft Risk Assessment for Registration Review [WWW Document]. URL <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2011-0840-0080> (accessed 3.13.23).
- EPA, 2020. Guidance for Waiving Acute Dermal Toxicity Tests for Pesticide Technical Chemicals & Supporting Retrospective Analysis [WWW Document]. URL <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2016-0093-0181> (accessed 3.7.23).
- EPA, 2018. Strategic Plan to Promote the Development and Implementation of Alternative Test Methods Within the TSCA Program.
- EPA, 2015. Use of an Alternate testing framework for classification of eye irritation [WWW Document]. URL [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-05/documents/eye\\_policy2015update.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-05/documents/eye_policy2015update.pdf) (accessed 11.13.23).
- EURL ECVAM, 2021. EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) [WWW Document]. URL [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam\\_en](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam_en) (accessed 11.3.22).
- Farmahin, R., Manning, G.E., Crump, D., Wu, D., Mundy, L.J., Jones, S.P., Hahn, M.E., Karchner, S.I., Giesy, J.P., Bursian, S.J., Zwiernik, M.J., Fredricks, T.B., Kennedy, S.W., 2013. Amino Acid Sequence of the Ligand-Binding Domain of the Aryl Hydrocarbon Receptor 1 Predicts Sensitivity of Wild Birds to Effects of Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences* 131, 139–152. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs259>
- FDA, 2023. MOU 225-23-003 Memorandum of understanding between the National Institutes of Health (NCATS) and the Food and Drug Administration (FDA) for the Microphysiological Systems Program [WWW Document]. FDA. URL <https://www.fda.gov/about-fda/domestic-mous/mou-225-23-003> (accessed 5.9.23).
- FDA, 2021a. Advancing New Alternative Methodologies at FDA [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/media/144891/download> (accessed 7.19.23).
- FDA, 2021b. S5(R3) Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals Guidance for Industry [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/media/148475/download>
- FDA, 2020. Qualification Process for Drug Development Tools Guidance for Industry and FDA Staff [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/media/133511/download> (accessed 7.19.23).

- FDA, 2018. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (accessed 7.31.23).
- FDA, 2017a. FDA's Predictive Toxicology Roadmap [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/media/109634/download> (accessed 5.5.22).
- FDA, 2017b. Qualification of Medical Device Development Tools: Guidance for Industry, Tool Developers, and Food and Drug Administration Staff [WWW Document]. FDA. URL <https://www.fda.gov/medical-devices/science-and-research-medical-devices/medical-device-development-tools-mddt> (accessed 5.5.22).
- Frick, A., Suzuki, O.T., Benton, C., Parks, B., Fedoriw, Y., Richards, K.L., Thomas, R.S., Wiltshire, T., 2015. Identifying genes that mediate anthracycline toxicity in immune cells. *Front Pharmacol* 6, 62. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00062>
- Friedman, K.P., Foster, M.J., Pham, L.L., Feshuk, M., Watford, S.M., Wambaugh, J.F., Judson, R.S., Setzer, R.W., Thomas, R.S., 2023. Reproducibility of organ-level effects in repeat dose animal studies. *Comput Toxicol* 28, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2023.100287>
- Harrill, A.H., 2020. ToxPoint: In the era of precision medicine, diversity should not be neglected in chemical safety assessment. *Toxicol Sci* 173, 3–4. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz232>
- Harrill, A.H., McAllister, K.A., 2017. New rodent population models may inform human health risk assessment and identification of genetic susceptibility to environmental exposures. *Environ Health Perspect* 125, 086002. <https://doi.org/10.1289/EHP1274>
- Hartung, T., 2010. Evidence-based toxicology - the toolbox of validation for the 21st century? *ALTEX* 27, 253–263. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.4.253>
- Hoffmann, S., Kleinstreuer, N., Alépée, N., Allen, D., Api, A.M., Ashikaga, T., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Goebel, C., Kern, P.S., Klaric, M., Kühnl, J., Lalko, J.F., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Parakhia, R., van Vliet, E., Zang, Q., Petersohn, D., 2018. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol* 48, 344–358. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429385>
- Hoffmann, S., Saliner, A.G., Patlewicz, G., Eskes, C., Zuang, V., Worth, A.P., 2008. A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals. *Toxicol Lett* 180, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.05.004>

- ICCVAM, 2022. Symposium Webinar: Using New Approach Methodologies to Address Variability and Susceptibility Across Populations [WWW Document]. URL <https://ntp.niehs.nih.gov/go/popvar> (accessed 3.13.23).
- ICCVAM, 2018. A Strategic Roadmap for Establishing New Approaches to Evaluate the Safety of Chemicals and Medical Products in the United States [WWW Document]. URL [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/roadmap/iccvam\\_strategicroadmap\\_january2018\\_documento\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/roadmap/iccvam_strategicroadmap_january2018_documento_508.pdf) (accessed 5.3.22).
- ICCVAM, 2003. ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods [WWW Document]. URL [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/subguidelines/sd\\_subg034508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/subguidelines/sd_subg034508.pdf) (accessed 5.3.22).
- ICCVAM, 1997. Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods [WWW Document]. URL [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/about\\_docs/validate.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/about_docs/validate.pdf) (accessed 3.7.23).
- ICH, 2013. ICH Harmonized Tripartite Guideline Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10 [WWW Document]. URL [https://database.ich.org/sites/default/files/S10\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/S10_Guideline.pdf)
- Ishikawa, K., 1985. What is Total Quality Control? The Japanese Way. Translated by Lu, David J., 1st ed. Prentice-Hall.
- Judson, R.S., Magpantay, F.M., Chickarmane, V., Haskell, C., Tania, N., Taylor, J., Xia, M., Huang, R., Rotroff, D.M., Filer, D.L., Houck, K.A., Martin, M.T., Sipes, N., Richard, A.M., Mansouri, K., Setzer, R.W., Knudsen, T.B., Crofton, K.M., Thomas, R.S., 2015. Integrated model of chemical perturbations of a biological pathway using 18 in vitro high-throughput screening assays for the estrogen receptor. *Toxicol Sci* 148, 137–154. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv168>
- Judson, R.S., Thomas, R.S., Baker, N., Simha, A., Howey, X.M., Marable, C., Kleinstreuer, N.C., Houck, K.A., 2019. Workflow for defining reference chemicals for assessing performance of in vitro assays. *ALTEX* 36, 261. <https://doi.org/10.14573/altex.1809281>
- Karmaus, A.L., Mansouri, K., To, K.T., Blake, B., Fitzpatrick, J., Strickland, J., Patlewicz, G., Allen, D., Casey, W., Kleinstreuer, N., 2022. Evaluation of variability across rat acute oral systemic toxicity studies. *Toxicological Sciences* 188, 34–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfac042>
- Kleinstreuer, N.C., Ceger, P., Watt, E.D., Martin, M., Houck, K., Browne, P., Thomas, R.S., Casey, W.M., Dix, D.J., Allen, D., Sakamuru, S., Xia, M., Huang, R., Judson, R., 2017. Development and validation of a computational model for androgen receptor activity. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 946–964. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00347>

- Kleinstreuer, N.C., Hoffmann, S., Alépée, N., Allen, D., Ashikaga, T., Casey, W., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Göbel, C., Kern, P.S., Klaric, M., Kühnl, J., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Strickland, J., van Vliet, E., Zang, Q., Petersohn, D., 2018. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches \*. *Crit Rev Toxicol* 48, 359–374. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429386>
- Kolle, S.N., Van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2017. Lacking applicability of in vitro eye irritation methods to identify seriously eye irritating agrochemical formulations: Results of bovine cornea opacity and permeability assay, isolated chicken eye test and the EpiOcular; ET-50 method to classify according to UN GHS. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 85, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.01.013>
- Krishna, S., Berridge, B., Kleinstreuer, N., 2021. High-throughput screening to identify chemical cardiotoxic potential. *Chem Res Toxicol* 34, 566–583. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00382>
- LaLone, C.A., Villeneuve, D.L., Lyons, D., Helgen, H.W., Robinson, S.L., Swintek, J.A., Saari, T.W., Ankley, G.T., 2016. Editor’s Highlight: Sequence Alignment to Predict Across Species Susceptibility (SeqAPASS): A Web-Based Tool for Addressing the Challenges of Cross-Species Extrapolation of Chemical Toxicity. *Toxicol. Sci.* 153, 228–245. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw119>
- Luechtefeld, T., Maertens, A., Russo, D.P., Rovida, C., Zhu, H., Hartung, T., 2016. Analysis of public oral toxicity data from REACH registrations 2008-2014. *ALTEX* 33, 111–122. <https://doi.org/10.14573/altex.1510054>
- Madia, F., Pillo, G., Worth, A., Corvi, R., Prieto, P., 2021. Integration of data across toxicity endpoints for improved safety assessment of chemicals: the example of carcinogenicity assessment. *Arch Toxicol* 95, 1971–1993. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03035-x>
- NIEHS, 2023a. Testing Regulations and Guidelines [WWW Document]. National Toxicology Program. URL <https://ntp.niehs.nih.gov/go/837330> (accessed 7.19.23).
- NIEHS, 2023b. Funding Opportunities for Test Method Developers [WWW Document]. Funding Opportunities for Test Method Developers. URL <https://ntp.niehs.nih.gov/go/alt-funding> (accessed 5.9.23).
- NIEHS, 2023c. International Cooperation on Alternative Test Methods [WWW Document]. International Cooperation on Alternative Test Methods. URL <https://ntp.niehs.nih.gov/go/icatm> (accessed 5.9.23).
- NIEHS, 2023d. About ICCVAM [WWW Document]. About ICCVAM. URL <https://ntp.niehs.nih.gov/go/iccvam> (accessed 5.9.23).

- OECD, 2023. No. 377: Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In-Vitro Testing Battery, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2022a. No. 364: Case study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for DNT to prioritize a class of Organophosphorus flame retardants, Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2022b. No. 367: Case Study on the use of an Integrated Approach for Testing and Assessment (IATA) for New Approach Methodology (NAM) for Refining Inhalation Risk Assessment from Point of Contact Toxicity of the Pesticide, Chlorothalonil, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2021a. Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2021b. No. 298: Guiding Principles on Good Practices for the Availability/Distribution of Protected Elements in OECD Test Guidelines, Series on Testing and Assessment. OECD Publishing.
- OECD, 2018. No. 286: Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing.  
<https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>
- OECD, 2017. No. 255: Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264274822-en>
- OECD, 2014. No. 203: New Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2007. No. 69: Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models, OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264085442-en>.
- OECD, 2005. No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 1998. No. 1: OECD Principles of Good Laboratory Practice, Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. OECD Publishing, Paris.
- Pamies, D., Leist, M., Coecke, S., Bowe, G., Allen, D.G., Gstraunthaler, G., Bal-Price, A., Pistollato, F., Vries, R.B.M. de, Hogberg, H.T., Hartung, T., Stacey, G., 2022. Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0). ALTEX -

- Alternatives to animal experimentation 39, 30–70.  
<https://doi.org/10.14573/altex.2111011>
- Parish, S.T., Aschner, M., Casey, W., Corvaro, M., Embry, M.R., Fitzpatrick, S., Kidd, D., Kleinstreuer, N.C., Lima, B.S., Settivari, R.S., Wolf, D.C., Yamazaki, D., Boobis, A., 2020. An evaluation framework for new approach methodologies (NAMs) for human health safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 112, 104592. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104592>
- Petersen, E., 2021. Characteristics to consider when selecting a positive control material for an in vitro assay. *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.2102111>
- Petersen, E.J., Ceger, P., Allen, D.G., Coyle, J., Derk, R., Garcia-Reyero, N., Gordon, J., Kleinstreuer, N.C., Matheson, J., McShan, D., Nelson, B.C., Patri, A.K., Rice, P., Rojanasakul, L., Sasidharan, A., Scarano, L., Chang, X., 2022a. U.S. federal agency interests and key considerations for new approach methodologies for nanomaterials. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 39, 183–206. <https://doi.org/10.14573/altex.2105041>
- Petersen, E.J., Elliott, J.T., Gordon, J., Kleinstreuer, N.C., Reinke, E., Roesslein, M., Toman, B., 2022b. Technical framework for enabling high-quality measurements in new approach methodologies (NAMs). *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*. <https://doi.org/10.14573/altex.2205081>
- Petersen, E.J., Uhl, R., Toman, B., Elliott, J.T., Strickland, J., Truax, J., Gordon, J., 2022c. Development of a 96-well electrophilic allergen screening assay for skin sensitization using a measurement science approach. *Toxics* 10, 257. <https://doi.org/10.3390/toxics10050257>
- Pham, L.L., Watford, S., Pradeep, P., Martin, M.T., Thomas, R., Judson, R., Setzer, R.W., Paul Friedman, K., 2020. Variability in in vivo studies: Defining the upper limit of performance for predictions of systemic effect levels. *Comput Toxicol* 15, 1–100126. <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2020.100126>
- Piersma, A.H., van Benthem, J., Ezendam, J., Kienhuis, A.S., 2018. Validation redefined. *Toxicol In Vitro* 46, 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.013>
- Prior, H., Casey, W., Kimber, I., Whelan, M., Sewell, F., 2019. Reflections on the progress towards non-animal methods for acute toxicity testing of chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 102, 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.12.008>
- Rooney, J.P., Choksi, N.Y., Ceger, P., Daniel, A.B., Truax, J., Allen, D., Kleinstreuer, N., 2021. Analysis of variability in the rabbit skin irritation assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 122, 104920. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104920>

- Rösslein, M., Elliott, J.T., Salit, M., Petersen, E.J., Hirsch, C., Krug, H.F., Wick, P., 2015. Use of Cause-and-Effect Analysis to Design a High-Quality Nanocytotoxicology Assay. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 21–30. <https://doi.org/10.1021/tx500327y>
- Rusyn, I., Chiu, W.A., Wright, F.A., 2022. Model systems and organisms for addressing inter- and intra-species variability in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 132, 105197. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105197>
- Sewell, F., Doe, J., Gellatly, N., Ragan, I., Burden, N., 2017. Steps towards the international regulatory acceptance of non-animal methodology in safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 89, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.001>
- Shaffer, R.M., 2021. Environmental Health Risk Assessment in the Federal Government: A Visual Overview and a Renewed Call for Coordination. *Environ. Sci. Technol.* 55, 10923–10927. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01955>
- Slezák, P., Waczulíková, I., 2011. Letter to the Editor: Reproducibility and Repeatability. *Physiol Res* 60, 203–205.
- Smirnova, L., Hogberg, H.T., Leist, M., Hartung, T., 2014. Developmental neurotoxicity - challenges in the 21st century and in vitro opportunities. *ALTEX* 31, 129–156. <https://doi.org/10.14573/altex.1403271>
- Strickland, J., Clippinger, A.J., Brown, J., Allen, D., Jacobs, A., Matheson, J., Lowit, A., Reinke, E.N., Johnson, M.S., Quinn, M.J., Mattie, D., Fitzpatrick, S.C., Ahir, S., Kleinstreuer, N., Casey, W., 2018. Status of acute systemic toxicity testing requirements and data uses by U.S. regulatory agencies. *Regul Toxicol Pharmacol* 94, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.01.022>
- Strickland, J., Daniel, A.B., Allen, D., Aguila, C., Ahir, S., Bancos, S., Craig, E., Germolec, D., Ghosh, C., Hudson, N.L., Jacobs, A., Lehmann, D.M., Matheson, J., Reinke, E.N., Sadrieh, N., Vukmanovic, S., Kleinstreuer, N., 2019. Skin sensitization testing needs and data uses by US regulatory and research agencies. *Arch Toxicol* 93, 273–291. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2341-6>
- Thomas, R.S., Bahadori, T., Buckley, T.J., Cowden, J., Deisenroth, C., Dionisio, K.L., Frithsen, J.B., Grulke, C.M., Gwinn, M.R., Harrill, J.A., Higuchi, M., Houck, K.A., Hughes, M.F., Hunter, E.S., Isaacs, K.K., Judson, R.S., Knudsen, T.B., Lambert, J.C., Linnenbrink, M., Martin, T.M., Newton, S.R., Padilla, S., Patlewicz, G., Paul-Friedman, K., Phillips, K.A., Richard, A.M., Sams, R., Shafer, T.J., Setzer, R.W., Shah, I., Simmons, J.E., Simmons, S.O., Singh, A., Sobus, J.R., Strynar, M., Swank, A., Tornero-Valez, R., Ulrich, E.M., Villeneuve, D.L., Wambaugh, J.F., Wetmore, B.A., Williams, A.J., 2019. The next generation blueprint of computational toxicology at the U.S. Environmental Protection Agency. *Toxicol Sci* 169, 317–332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz058>

- Tox21, n.d. Tox21 - Toxicology in the 21st Century [WWW Document]. Tox21. URL <https://tox21.gov/> (accessed 5.9.23).
- Tsuji, R., Crofton, K.M., 2012. Developmental neurotoxicity guideline study: issues with methodology, evaluation and regulation. *Congenit Anom (Kyoto)* 52, 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00374.x>
- van der Zalm, A.J., Barroso, J., Browne, P., Casey, W., Gordon, J., Henry, T.R., Kleinstreuer, N.C., Lowit, A.B., Perron, M., Clippinger, A.J., 2022. A framework for establishing scientific confidence in new approach methodologies. *Arch Toxicol* 96, 2865–2879. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03365-4>
- Wikoff, D., Lewis, R.J., Erraguntla, N., Franzen, A., Foreman, J., 2020. Facilitation of risk assessment with evidence-based methods – A framework for use of systematic mapping and systematic reviews in determining hazard, developing toxicity values, and characterizing uncertainty. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 118, 104790. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104790>
- Wilkinson, M.D., Dumontier, M., Aalbersberg, I.J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J.-W., da Silva Santos, L.B., Bourne, P.E., Bouwman, J., Brookes, A.J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C.T., Finkers, R., Gonzalez-Beltran, A., Gray, A.J.G., Groth, P., Goble, C., Grethe, J.S., Heringa, J., 't Hoen, P.A.C., Hooft, R., Kuhn, T., Kok, R., Kok, J., Lusher, S.J., Martone, M.E., Mons, A., Packer, A.L., Persson, B., Rocca-Serra, P., Roos, M., van Schaik, R., Sansone, S.-A., Schultes, E., Sengstag, T., Slater, T., Strawn, G., Swertz, M.A., Thompson, M., van der Lei, J., van Mulligen, E., Velterop, J., Waagmeester, A., Wittenburg, P., Wolstencroft, K., Zhao, J., Mons, B., 2016. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data* 3, 160018. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>
- Wolffe, T.A.M., Whaley, P., Halsall, C., Rooney, A.A., Walker, V.R., 2019. Systematic evidence maps as a novel tool to support evidence-based decision-making in chemicals policy and risk management. *Environ Int* 130, 104871. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.065>
- Zhang, J.H., Chung, T.D., Oldenburg, K.R., 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4, 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- Zhang, X.D., 2011. Illustration of SSMD, z score, SSMD\*, z\* score, and t statistic for hit selection in RNAi high-throughput screens. *J Biomol Screen* 16, 775–785. <https://doi.org/10.1177/10870571111405851>

## APÊNDICE A: GLOSSÁRIO

**AVISO LEGAL:** este glossário tem como objetivo auxiliar no uso da terminologia neste relatório. O significado ou uso de um termo específico pode variar entre as agências reguladoras.

**3Rs:** princípios de técnica experimental humana, especificamente em relação à redução (ou seja, minimização do número de animais usados), substituição (ou seja, uso de uma espécie de ordem inferior ou teste não animal) ou refinamento (ou seja, minimização da dor ou sofrimento pelo qual os animais de pesquisa podem passar devido a uma determinada técnica) do uso de animais em pesquisas e testes de segurança química.

**Abordagem definida (DA):** consiste em dados de entrada gerados com um conjunto definido de fontes de informação e um procedimento fixo de interpretação de dados para obter um resultado que pode ser usado sozinho ou em conjunto com outras fontes de informação dentro de uma IATA para satisfazer uma necessidade regulatória específica. Uma abordagem definida para teste e avaliação pode ser usada para corroborar a identificação de perigos, caracterização de perigos e/ou avaliação de segurança de produtos químicos (OCDE, 2017).

**Abordagem Integrada de Teste e Avaliação (IATA):** uma abordagem baseada em várias fontes de informação usadas para a identificação de perigos, caracterização de perigos e/ou avaliação de segurança de produtos químicos (OCDE, 2017).

**Adequado(a) à finalidade:** correspondência entre o tipo e a certeza das informações fornecidas por uma NAM (ou conjunto de NAMs) e o tipo e a certeza das informações necessárias para uma determinada decisão (EPA, 2021a).

**Avaliação de risco:** avaliação dos possíveis efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente de uma espécie-alvo decorrentes da exposição a agentes exógenos.

**Banco de dados/lista com curadoria:** um conjunto estruturado de informações bem caracterizadas e confiáveis que são cuidadosamente compiladas e conservadas.

**Boas Prática em Métodos In Vitro (GIVIMP):** uma estrutura abrangente descrita no Documento de Orientação da OCDE sobre Boas Práticas do Método In Vitro (OCDE, 2018) que fornece recomendações para o desenvolvimento, validação, aceitação ou qualificação regulatória e uso de métodos *in vitro*.

**Boas Práticas de Laboratório (BPL):** regulamentos promulgados por autoridades como a EPA dos EUA, o FDA dos EUA e a OCDE que descrevem procedimentos de manutenção de registros e garantia de qualidade para registros laboratoriais que servirão de base para o envio de dados às agências reguladoras nacionais.

**Boas Práticas em Cultura Celular (GCCP):** um conjunto de princípios desenvolvidos para uso prático em laboratório para garantir a reprodutibilidade do trabalho *in vitro* (baseado em células) e melhorar a qualidade dos dados científicos (Pamies et al., 2022).

**Classificação de perigo:** atribuição de um risco químico ou de produto a uma categoria com base nos resultados de um método de ensaio padrão para um parâmetro de toxicidade específico; mais comumente usado para fins de rotulagem.

**Compostos de referência:** produtos químicos selecionados para uso durante a pesquisa, desenvolvimento ou avaliação de um método de ensaio proposto porque sua resposta no método de ensaio de referência ou na espécie de interesse é conhecida (vide “método de ensaio de referência”).

**Concordância:** a proximidade da concordância ou congruência entre duas variáveis. A concordância pode ser usada para descrever qualitativamente a relevância biológica de uma NAM em comparação com o método de ensaio em animais de referência e/ou dados de referência em humanos, quando disponíveis. A concordância também pode ser usada para descrever quantitativamente a proporção de todos os produtos químicos testados que são classificados corretamente como positivos ou negativos, e o termo é frequentemente usado de forma intercambiável com “exatidão” nesse contexto.

**Confiabilidade:** medida do grau em que um método de ensaio pode ser realizado de forma reprodutível dentro e entre laboratórios ao longo do tempo. É avaliado pelo cálculo da reprodutibilidade intra e interlaboratorial e da repetibilidade intralaboratorial.

**Contexto de uso (COU):** uma descrição claramente articulada que delinea a forma e a finalidade de uso de um determinado método, abordagem ou aplicação.

**Controle de qualidade:** um conjunto de atividades ou amostras usadas para verificar se a qualidade do produto ou método é mantida conforme o esperado.

**Curva padrão:** método quantitativo de representação gráfica de dados de ensaio para determinar a concentração de uma substância em uma amostra desconhecida, comparando a desconhecida a uma amostra padrão de concentração conhecida (geralmente usando o material de controle positivo).

**Desempenho:** as características de exatidão e confiabilidade de um método de ensaio (vide “exatidão”, “confiabilidade”).

**Desenvolvedor do método de ensaio:** organização ou indivíduo que inicialmente concebe um método de ensaio e garante sua reprodutibilidade e adequação ao uso pretendido.

**Discordância:** a proporção de todos os produtos químicos testados e classificados incorretamente como positivos ou negativos.

**Domínio de aplicabilidade:** os tipos de produtos químicos que podem ser testados usando um método ou os tipos de produtos químicos para os quais os resultados produzidos por esse método são considerados aceitáveis.

**Endpoint:** o processo, resposta ou efeito biológico ou químico avaliado por um método de ensaio.

**Ensaio:** o sistema experimental usado. Frequentemente usado de forma intercambiável com “teste” e “método de ensaio”.

**Envio do método de ensaio:** compêndio de documentação de apoio para um método de ensaio proposto para uma aplicação regulamentar ou outra aplicação definida. O envio de um método de ensaio geralmente inclui registros de estudos de validação que foram concluídos para caracterizar a utilidade e as limitações do método de ensaio para um requisito ou aplicação específica de teste regulatório proposto, bem como outra documentação adequada da validade científica preparada de acordo com as diretrizes de envio do método de ensaio.

**Espécie-alvo:** espécie para a qual são buscadas informações sobre a possível toxicidade de um produto químico.

**Especificidade:** proporção de todos os produtos químicos negativos que são classificados corretamente como negativos em um método de ensaio. É uma medida da exatidão do método de ensaio. Essa palavra também é usada para descrever a capacidade de um método analítico detectar um analito específico.

**Estabilidade:** capacidade de um material de teste (por exemplo, substância de ensaio, aparelho de teste, reagente ou analito) de produzir resultados semelhantes e aceitáveis durante um período em um determinado ambiente.

**Exatidão balanceada:** uma métrica estatística usada para contabilizar um conjunto de dados desequilibrado em que uma “classe” aparece muito mais do que a outra (por exemplo, maior número de negativos do que positivos). A exatidão balanceada é calculada como a média aritmética de sensibilidade e especificidade.

**Exatidão:** a proximidade da concordância entre o resultado de um método de ensaio e um valor de referência aceito.

**Falso negativo:** uma substância identificada incorretamente como negativa por um método de ensaio em relação aos dados de referência especificados.

**Falso positivo:** uma substância identificada incorretamente como positiva por um método de ensaio em relação aos dados de referência especificados.

**Identificação de perigos:** a parte da avaliação de risco relativa à determinação da possibilidade de que a exposição a uma certa substância esteja ou possa estar associada a efeitos adversos à saúde ou ecológicos.

**Método de ensaio de referência:** método de ensaio aceito usado para fins regulatórios para avaliar o potencial de uma substância de ensaio ser perigosa para a espécie de interesse.

**Método de ensaio validado:** um método de ensaio aceito para o qual estudos de validação foram concluídos para determinar a exatidão, confiabilidade e relevância desse método para um uso específico proposto.

**Método de ensaio:** processo ou procedimento usado para obter informações sobre as características de uma substância ou agente. Os métodos de ensaio toxicológico geram informações sobre a capacidade de uma substância ou agente de produzir um efeito biológico específico sob condições específicas. Usado de forma intercambiável com “teste” e “ensaio”. Veja também “método de ensaio validado” e “método de ensaio de referência”.

**Nova metodologia de abordagem (NAM):** uma referência amplamente descritiva a qualquer tecnologia, metodologia, abordagem ou combinação delas que possa ser usada para fornecer informações sobre perigo químico e avaliação de risco e que corrobore a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais (3Rs).

**Órgão-alvo:** órgão para o qual são buscadas informações sobre a possível toxicidade de um produto químico.

**Padrões de desempenho:** padrões, baseados em um método de ensaio validado, que fornecem uma base para avaliar a comparabilidade de um método de ensaio proposto que seja similar do ponto de vista mecanicista e funcional. Estão incluídos (1) componentes essenciais do método de ensaio; (2) uma lista de produtos químicos de referência selecionados dentre os produtos químicos usados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (3) os níveis comparáveis de exatidão e confiabilidade, com base no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado usando a lista mínima de produtos químicos de referência.

**Patrocinador do método de ensaio:** organização ou indivíduo que apresenta o envio de um método de ensaio para consideração; também pode ser a mesma organização ou indivíduo que o desenvolvedor do método de ensaio.

**Perigo:** o potencial de um efeito adverso ou prejudicial à saúde ou ao meio ambiente.

**Potência:** uma medida da atividade biológica ou química relativa de uma substância. A potência de uma única substância pode diferir para diferentes efeitos biológicos ou bioquímicos.

**Precisão:** a proximidade das medições individuais de um analito após várias análises, geralmente de uma única amostra. A precisão geralmente é expressa como o coeficiente de variação.

**Previsibilidade negativa:** a proporção de respostas negativas corretas em relação aos dados de referência definidos entre substâncias que apresentam um resultado negativo em um método de ensaio. É um indicador da exatidão do método de ensaio. A preditividade negativa é função da especificidade do método de ensaio e da prevalência de negativos entre as substâncias testadas.

**Previsibilidade positiva:** a proporção de respostas positivas corretas entre substâncias que apresentam resultados positivos em relação aos dados de referência definidos por um método de ensaio. É um indicador da exatidão do método de ensaio. A preditividade positiva é função da sensibilidade do método de ensaio e da prevalência de positivos entre as substâncias testadas.

**Procedimentos operacionais padrão (SOPs):** procedimentos formais e escritos que descrevem como as operações laboratoriais específicas devem ser realizadas. Eles são exigidos pelas diretrizes de BPL.

**Protocolo:** descrição precisa passo a passo de um método de ensaio, incluindo a lista de todos os reagentes necessários e todos os critérios e procedimentos para gerar e avaliar dados de teste.

**Qualificação:** conclusão de que se pode confiar nos resultados de uma avaliação usando um modelo ou ensaio validado para uma interpretação e aplicação específicas no desenvolvimento de produtos e na tomada de decisões regulatórias.

**Recuperação:** método quantitativo para verificar a eficiência e reprodutibilidade de um método de extração comparando os resultados das amostras extraídas com os resultados de amostras enriquecidas de uma matriz similar e/ou blocos enriquecidos.

**Relevância biológica:** uma medida de adequação para avaliar os efeitos de uma substância química nos táxons de interesse.

**Relevância mecanicista:** uma medida de adequação para avaliar o processo bioquímico ou a via pela qual um produto químico pode exercer um efeito.

**Repetibilidade:** a constância dos resultados do teste obtidos quando o procedimento é realizado na mesma substância sob condições idênticas dentro de um determinado período de tempo; “... a proximidade da concordância entre resultados independentes obtidos com o mesmo método em indivíduos (ou objeto ou material de teste) idênticos, *sob as mesmas condições*” (Slezák e Waczulíková, 2011).

**Reprodutibilidade interlaboratorial:** uma medida para avaliar se diferentes laboratórios qualificados que usam o mesmo protocolo e produtos químicos de teste podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente semelhantes. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica até que ponto um método de ensaio pode ser transferido com sucesso entre laboratórios.

**Reprodutibilidade:** a constância dos resultados de testes individuais obtidos usando o mesmo protocolo de teste e amostras de teste; “... a proximidade da concordância entre resultados independentes obtidos com o mesmo método em indivíduos (ou objeto, ou material de teste) idênticos, *mas sob condições diferentes* (diferentes observadores, laboratórios etc.)” (Slezák e Waczulíková, 2011).

**Robustez:** capacidade de um método de ser reproduzido sob diferentes condições ou circunstâncias, sem a ocorrência de diferenças inesperadas nos resultados obtidos.

**Sensibilidade:** proporção de todos os produtos químicos positivos que são classificados corretamente como positivos em um método de ensaio. A sensibilidade também pode ser definida no contexto dos limites de detecção como a menor concentração de analito que pode ser medida com exatidão e/ou precisão aceitáveis.

**Teste:** o sistema experimental usado; usado de forma intercambiável com “método de ensaio” e “ensaio”.

**Transferibilidade:** capacidade de um método ou procedimento de teste ser realizado com exatidão e confiabilidade em laboratórios diferentes e competentes. Veja também “reprodutibilidade interlaboratorial”.

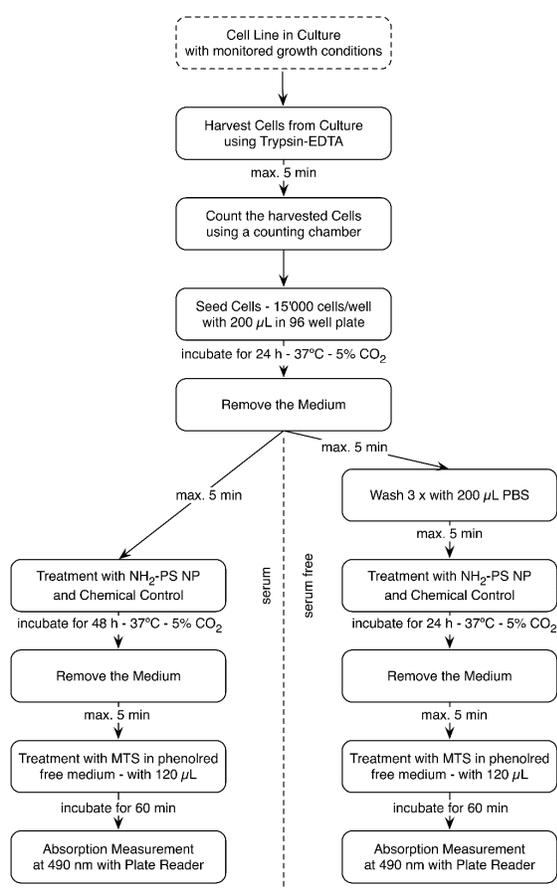
**Validação:** processo pelo qual a exatidão, a confiabilidade e a relevância de um procedimento são estabelecidas para uma finalidade específica. A validação para uma finalidade específica não implica validação para outras finalidades específicas. Qualificações adicionais podem ser necessárias para um contexto específico de uso.

**Via de resultados adversos (AOP):** uma representação estruturada de eventos sequenciais que ocorrem em diferentes níveis de organização biológica, resultando em um efeito adverso quando um organismo é exposto a uma substância.

## APÊNDICE B: FERRAMENTAS DE QUALIDADE

### 1.0 Fluxogramas

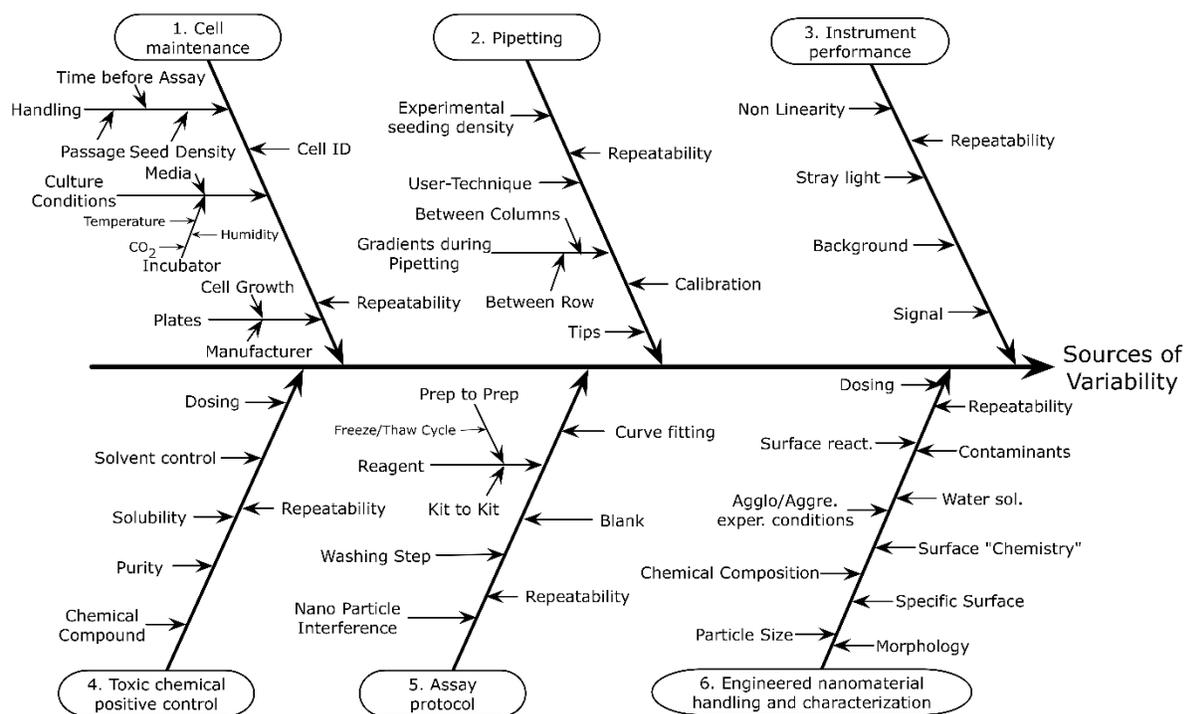
Em um fluxograma, cada etapa de um protocolo é diagramada (veja um exemplo na Figura S1). Isso pode ser útil na criação de medidas de controle para o experimento, garantindo que cada etapa seja abordada e monitorada quando viável. É possível que mais de uma medição de controle abranja uma única etapa e, inversamente, uma medição de controle pode abranger várias etapas. Além disso, a comparação das medidas de controle entre as NAMs pode revelar etapas semelhantes entre as diferentes NAMs. Para essas etapas, as fontes de variabilidade provavelmente também serão semelhantes.



**Figura 1 complementar.** Fluxograma descrevendo o protocolo MTS modificado (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) para um estudo interlaboratorial. Esta figura foi reproduzida com permissão de Elliott et al. (2017).

## 2.0 Análise de causa e efeito

A análise de causa e efeito (C&E) é uma ferramenta conceitual que pode ser usada para identificar possíveis fontes-chave de variabilidade e exibi-las usando diagramas C&E, às vezes conhecidos como diagramas de espinha de peixe (veja um exemplo na Figura S2). O processo de desenvolvimento desses diagramas pode incluir o brainstorming e a revisão da literatura sobre um ensaio. Cada ramificação do diagrama C&E indica uma fonte-chave da variabilidade esperada. Os diagramas de C&E também podem fundamentar o desenvolvimento de novas NAMs, porque ramificações compartilhadas dos diagramas de C&E (por exemplo, realização de medições usando o mesmo tipo de ensaio de citotoxicidade) podem ser feitas mais rapidamente, provavelmente exigirão medidas de controle semelhantes e provavelmente terão estratégias de mitigação de variabilidade semelhantes. A análise dos diagramas de C&E pode ajudar a identificar aspectos de um método que possam ser difíceis de padronizar (por exemplo, um instrumento difícil de calibrar ou reagentes de ensaio instáveis). Os diagramas C&E podem ajudar a orientar os testes de robustez e a seleção de medidas de controle para que, idealmente, as fontes de variabilidade em cada ramo e sub-ramo do diagrama C&E sejam analisadas.

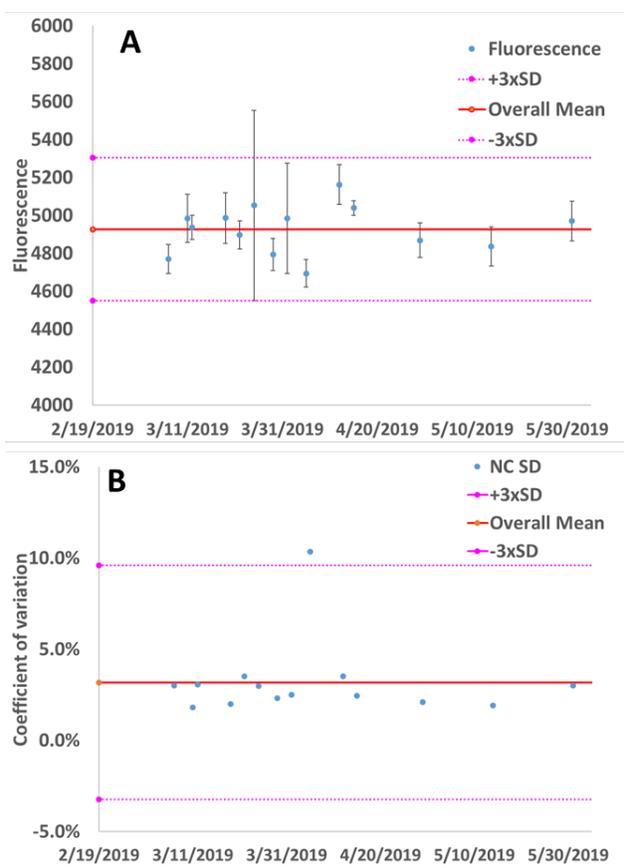


**Figura 2 complementar.** Diagrama de causa e efeito de um ensaio de citotoxicidade MTS criado para ser usado com nanomateriais projetados. Reproduzido com permissão de Rösslein et al. (2015).

### 3.0 Gráficos de controle

As medições de controle podem ser experimentos preliminares únicos (por exemplo, para testar possíveis vieses), medições periódicas realizadas em uma frequência predeterminada (por exemplo, avaliação do desempenho e calibração do instrumento) e medições de controle em processo feitas sempre que o ensaio é realizado. Para alguns ensaios que permitem que um número limitado de amostras seja analisado simultaneamente (por exemplo, um ensaio de inalação com exposição a produtos químicos aerossolizados usando um sistema de exposição contínua), medições periódicas podem ser úteis. Experimentos preliminares únicos podem ser úteis para avaliar se uma substância de ensaio pode causar um viés, por exemplo, se uma nanopartícula pode adsorver um reagente-chave do ensaio. As medições de controle internas do processo podem ser usadas para medir as principais fontes de variabilidade a cada vez que o ensaio é realizado. Por exemplo, uma medição comum de controle em processo é o controle positivo. Essa medição de controle pode revelar se uma resposta máxima (efeito de 100%) foi alcançada e também pode ser usada para demonstrar a sensibilidade da resposta do ensaio a concentrações químicas que produzem respostas mais baixas e moderadas. As principais considerações para selecionar um controle positivo foram descritas por Petersen et al. (2021). Outras medições comuns de controle internas do processo consistem em um controle sem células e sem reagentes de ensaio adicionais e um controle com adição de células e reagentes de ensaio adicionais, mas sem substâncias de ensaio. Talvez não seja possível incluir todas as medições de controle internas do processo, e pode haver compensações em termos de quais medidas de controle internas do processo incluir.

As principais fontes de variabilidade podem ser monitoradas ao longo do tempo e entre experimentos usando gráficos de controle que exibem os valores médios e a variabilidade das medições de controle internas do processo (veja um exemplo na Figura S3). Isso pode ser útil para avaliar se há mudanças sistemáticas nos valores médios ou de variabilidade ao longo do tempo que sugerem que algo no ensaio pode ter mudado (por exemplo, instabilidade de um reagente). A análise das fichas de verificação pode ser útil para identificar por que as mudanças ocorreram.



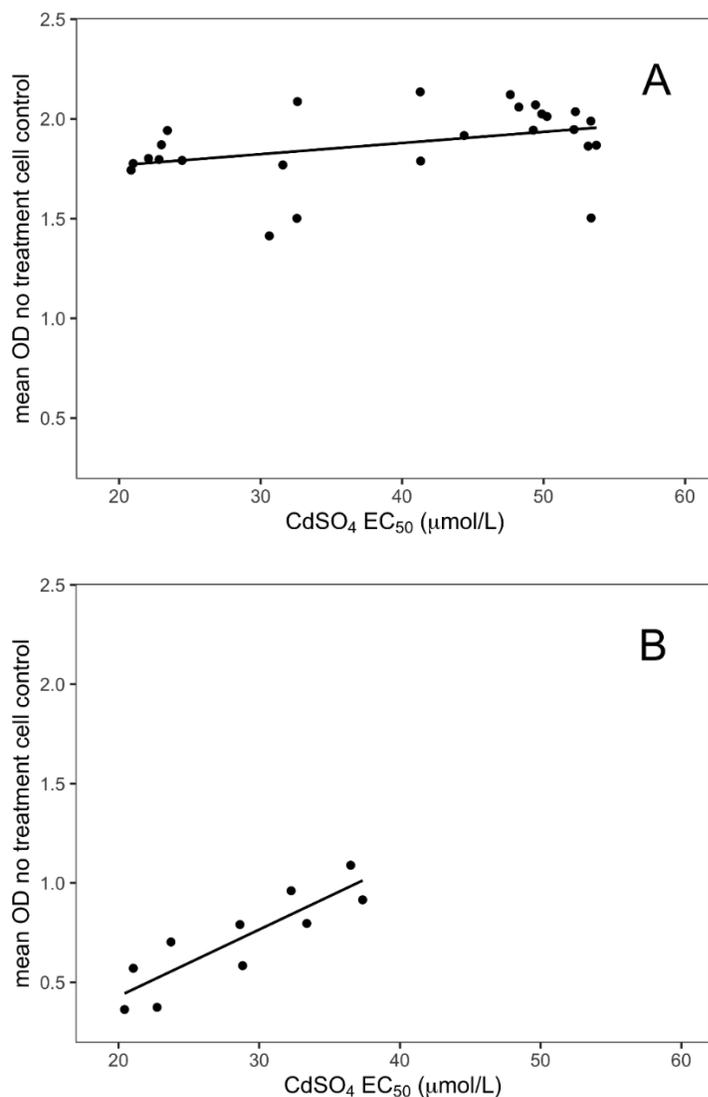
**Figura 3 complementar.** Dados de gráficos de controle para o método de fluorescência do ensaio de triagem de alérgenos eletrofilicos para o controle negativo da incubadora: (A) média e (B) coeficiente de variação para todos os experimentos, dependendo da data em que foram realizados. No gráfico B, um valor é um valor atípico para o coeficiente de variação e está fora das especificações deste estudo (média geral  $\pm 3$  vezes o valor médio do desvio padrão). Além disso, não há uma tendência sistemática com os valores médios ou coeficientes de variação ao longo do tempo. Esta figura foi modificada e reproduzida com permissão de Petersen et al. (2022c), enquanto a legenda da figura foi modificada e reproduzida de Petersen et al. (2022b).

#### **4.0 Fichas de verificação**

Para registrar os principais metadados e atender aos requisitos de BPL, fichas de verificação podem ser usadas. Se as BPL não forem aplicadas quando um método estiver sendo desenvolvido, os princípios estabelecidos de BPL como o registro de dados-chave usando fichas de verificação, serão importantes se as NAMs forem destinadas a submissões regulatórias, quando a conformidade com as BPL puder ser necessária. Recursos alternativos relevantes durante o desenvolvimento do ensaio são o documento de orientação sobre GCCP 2.0 (Pamies et al., 2022) e GIVIMP (OCDE, 2018), que são específicos para trabalhos baseados em células com listas adicionais de gerenciamento de qualidade para garantir reprodutibilidade e dados científicos de alta qualidade. As fichas de verificação também podem ser úteis para monitorar as medições de controle internas do processo e auxiliar na solução de problemas quando surgirem. Por exemplo, elas podem ser usadas para documentar mudanças nos números de lotes de reagentes e suprimentos consumíveis (por exemplo, pipetas e placas de micropoços). Isso pode ser valioso para solucionar problemas se uma especificação não for atendida com mais frequência do que outras especificações. Também é possível que fichas de verificação que incluam calculadoras de dados avaliem se os dados de um ensaio atendem a todas as especificações e realizem avaliações estatísticas dos resultados do ensaio. Cadernos eletrônicos e sistemas de gerenciamento de informações laboratoriais podem ser usados em vez de fichas de verificação escritas (com vantagens como facilidade de armazenamento, transferibilidade entre laboratórios e capacidade de pesquisa).

#### **5.0 Gráficos de dispersão**

Os gráficos de dispersão podem ser usados para avaliar se há uma interação entre diferentes medições de controle internas do processo ou entre essas medições de controle e os resultados da substância de ensaio (veja um exemplo na Figura S4). Os resultados da substância de ensaio devem ser independentes dos resultados das medições de controle internas do processo dentro do intervalo estabelecido pelas especificações.



**Figura 4 complementar.** Correlação dos valores de  $EC_{50}$  do de sulfato de cádmio ( $CdSO_4$ ) determinados usando o ensaio MTS com os valores médios de densidade óptica (OD) em células A549 não expostas a uma substância de ensaio ou ao controle positivo. Esses dados mostram uma falta de interação entre os valores de  $EC_{50}$  (parte A) ou uma interação (parte B) dependendo da faixa de valores médios de OD. As linhas contínuas representam ajustes de regressão linear. A inclinação na parte B é estatisticamente diferente de 0, indicando que o valor  $EC_{50}$  está correlacionado aos valores de OD. Modificado e reproduzido com permissão de Petersen et al. (2022b) e a legenda da figura é reproduzida com permissão de Petersen et al. (2022b).

## APÊNDICE C: AVALIAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

As informações no Apêndice C foram derivadas de várias referências, incluindo “Validação e aceitação regulatória de métodos de ensaio toxicológico” (ICCVAM, 1997), “Orientação de validação de métodos bioanalíticos para a indústria” (FDA, 2018), OCDE GD 34 (OCDE, 2005) e o documento GIVIMP da OCDE (OCDE, 2018). As informações no Apêndice C têm como objetivo fornecer uma estrutura geral para a avaliação do método. Alguns aspectos podem ou não ser aplicáveis a todos os métodos.

### 1.0 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação definem o intervalo de um método analítico. O método analítico geralmente é testado no limite inferior de quantificação ou no limite de detecção, o que for mais apropriado para o sistema. Esse processo determina a extremidade inferior do intervalo de um método analítico, estabelecendo a menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser detectada com segurança (limite de detecção) ou quantificada (limite inferior de quantificação) acima do reagente em branco ou dentro da curva padrão. A maior concentração na curva padrão determina o limite superior de quantificação.

### 2.0 Identificação de interferência

Os desenvolvedores de métodos devem documentar substâncias interferentes, que podem vir de componentes críticos e não críticos do método, incluindo qualquer interferência com o sinal detectado (por exemplo, fluorescência/absorbância, luciferase, enzimática) do método. A interferência também pode vir de consumíveis, como certos plásticos nos métodos de ensaio de desreguladores endócrinos, bem como de outros reagentes no método. As substâncias potencialmente interferentes incluem, entre outras, componentes da matriz endógena, metabólitos, produtos de decomposição e outros xenobióticos. Se o método se destina a quantificar mais de um analito, todos os analitos pretendidos devem ser testados para garantir que não haja interferência. Amostras em branco são frequentemente usadas para testar a interferência.

### 3.0 Avaliação da precisão analítica

É útil incluir uma descrição da precisão do método analítico usado e quaisquer outros testes de precisão, como aqueles que avaliam a variabilidade de desempenho quando diferentes equipes usam o método proposto ou quando é usada uma instrumentação diferente para o método, bem como a participação em estudos de comparação interlaboratoriais quando possível.

### 4.0 Estabilidade dos materiais

A estabilidade relativa aos materiais usados na NAM (por exemplo, substâncias de ensaio, aparelhos de teste, reagentes e analitos) se refere à capacidade de um material de produzir resultados semelhantes e aceitáveis durante um período em um determinado ambiente. A estabilidade da própria NAM foi discutida anteriormente (Apêndice B, Seção 3.0) com a

avaliação de gráficos de controle ao longo do tempo. Os efeitos das condições de coleta, manuseio e armazenamento de amostras devem ser avaliados. Os materiais que podem ser afetados por problemas de estabilidade devem receber datas de validade apropriadas. A estabilidade da substância de ensaio, dos reagentes e do aparelho de ensaio (por exemplo, microplaca de plástico) deve ser assegurada para evitar interferências de produtos de degradação e alterações na dose real aplicada. Os estudos de estabilidade realizados em qualquer um dos componentes devem ser incluídos nos relatórios. A estabilidade de quaisquer misturas químicas ou amostras preparadas que estejam sendo preparadas antes do dia do estudo deve ser avaliada quanto à estabilidade antes do uso em estudos de desenvolvimento, validação ou qualificação.

A estabilidade química de uma determinada mistura ou matriz sob condições específicas para determinados intervalos de tempo é avaliada de várias maneiras. As avaliações de estabilidade pré-estudo devem abranger as condições esperadas de manuseio e armazenamento da amostra durante a condução do estudo, incluindo as condições no local do teste, durante o transporte e em todos os outros locais secundários. A estabilidade de um analito em um determinado sistema de mistura, matriz e recipiente é relevante somente para essa mistura, matriz e sistema de recipiente e não deve ser extrapolada para outros sistemas. O teste de estabilidade deve avaliar a estabilidade dos analitos para armazenamento de longo prazo (congelados na temperatura de armazenamento pretendida) e de curto prazo (bancada, temperatura ambiente) e após os ciclos de congelamento e descongelamento e o processo analítico. As condições usadas em experimentos de estabilidade devem refletir situações prováveis de serem encontradas durante o manuseio e análise reais da amostra. Se, durante a análise da amostra para um estudo, as condições de armazenamento mudarem e/ou excederem as condições de armazenamento da amostra avaliadas durante a caracterização técnica do método, a estabilidade deve ser estabelecida sob essas novas condições. Estudos independentes de estabilidade devem ser conduzidos e abranger qualquer condição que um reagente crítico possa encontrar. O teste de estabilidade de um reagente ou material deve ser considerado em diversos contextos, inclusive durante ciclos de congelamento e descongelamento e uso na bancada, em soluções de estoque, em amostras processadas e em estudos de longo prazo.

## **5.0 Ensaio de robustez**

Robustez é a capacidade de um método de ser reproduzido sob diferentes condições ou circunstâncias, sem a ocorrência de diferenças inesperadas nos resultados obtidos. Um aspecto da robustez de uma NAM é a constância dos resultados dos gráficos de controle ao longo do tempo, conforme descrito no Apêndice B, Seção 3.0. O ensaio de robustez em geral é usado para detectar mudanças nos resultados de variações não intencionais em reagentes ou protocolos experimentais. O ensaio de robustez é recomendado para todos os aspectos dos métodos de ensaio, e os intervalos para todos os parâmetros e medições devem ser estabelecidos sempre que possível.

Por exemplo, um tempo de incubação de 5 minutos foi estabelecido como ideal para um estudo, mas após o ensaio de robustez, os dados foram aprovados em todos os requisitos de controle de qualidade em 5 minutos mais/menos 30 segundos. Portanto, o tempo de incubação aceitável testado para robustez seria de 5 minutos  $\pm$  30 segundos.

Alguns parâmetros do estudo que devem ter uma faixa de aceitação estabelecida são:

- Tempos de incubação
- Temperaturas de incubação
- pH
- Fontes de reagentes
- Densidades celulares (se aplicável)
- Condições experimentais
- Software de análise

O desenho do modelo determinará quais condições experimentais exigirão intervalos de aceitação. Por exemplo, modelos com mídia fluida precisarão de faixas de aceitação para parâmetros relacionados ao fluxo. Modelos mais complexos têm maior probabilidade de ter parâmetros de estudo que exijam controle.

Quando aplicável, os resultados dos ensaios de robustez para reagentes críticos e não críticos também devem ser relatados. Fornecedores diferentes (sempre que possível) devem ser testados para determinar se um reagente deve ser comprado de um fornecedor ou se vários fornecedores podem ser usados. Isso também pode ser útil para evitar interrupções na cadeia de suprimentos ou se um fabricante parar de fabricar um produto específico.

Os ensaios de robustez instrumental também devem ser realizados sempre que aplicável. A validação interlaboratorial geralmente envolve diferentes marcas de instrumentos com diferentes parâmetros e recursos de desempenho, o que pode aumentar a variabilidade dos dados ou alterar os parâmetros do método executado.

## **6.0 Análise de recuperação**

Estudos que executam testes em extrações de uma determinada matriz devem realizar estudos de recuperação para verificar a eficiência e reprodutibilidade do método de extração. Os estudos de recuperação geralmente são realizados comparando-se os resultados das amostras extraídas com os de amostras enriquecidas de uma matriz similar e/ou brancos enriquecidos.

## **7.0 Análise técnica do domínio de aplicabilidade**

Deve haver dados adequados do método de ensaio para produtos químicos e/ou produtos representativos dos relevantes para o COU específico para o qual o ensaio é proposto. A documentação da NAM, DA ou IATA deve descrever claramente as propriedades físico-químicas do domínio de aplicabilidade. Isso incluiria qualquer limitação do método, por exemplo, para produtos químicos com um intervalo de peso molecular, volatilidade, solubilidade ou estabilidade específicos.

Embora o domínio de aplicabilidade deva ser avaliado analiticamente durante o desenvolvimento inicial de um ensaio, dados adicionais podem se tornar disponíveis por meio do uso mais amplo do método. Esses dados podem revelar interferências que podem precisar ser abordadas tecnicamente com mais detalhes (Petersen et al., 2022a). Se um ensaio não for avaliado em relação a produtos químicos com certas propriedades físico-químicas, haverá maior incerteza em relação ao desempenho do ensaio para esses produtos químicos, tanto por considerações analíticas (por exemplo, se há vieses que afetam o desempenho do ensaio) quanto por uma possível concordância (por exemplo, se o ensaio produz resultados semelhantes aos de um ensaio *in vivo*). Portanto, também pode ser útil avaliar a concordância do ensaio entre produtos químicos com diferentes propriedades físico-químicas para aumentar a confiança na aplicabilidade do ensaio com uma gama mais ampla de produtos químicos.

## 8.0 Controle positivo

Pelo menos um controle positivo deve fazer parte do desenvolvimento do ensaio. Esses controles podem ser usados em conjunto com curvas padrão ou como uma única concentração para o controle positivo. Os controles positivos devem ser relevantes para o endpoint de detecção do ensaio. A concentração do controle positivo deve estar dentro da janela de detecção do ensaio. Muitas vezes, uma concentração de controle positivo é escolhida para produzir uma resposta entre 50% e 80% da faixa máxima de detecção se apenas uma única concentração for testada e dados sobre a resolução da dose máxima estiverem disponíveis. Uma curva padrão geralmente é produzida usando o controle positivo do sistema, com uma curva padrão definida como a relação entre a resposta do ensaio e as concentrações conhecidas do analito. A curva padrão deve ser reproduzível ao longo do tempo. As curvas padrão devem ser preparadas no mesmo veículo ou solvente que as amostras de ensaio pretendidas para o estudo. Quando a mesma mistura ou matriz não puder ser obtida, misturas ou matrizes substitutas podem ser usadas com documentação e justificativa adequadas.

## 9.0 Padrões de referência para calibração de instrumentos

Quando aplicável, os instrumentos devem ser calibrados usando padrões de calibração e/ou amostras de controle de qualidade. A origem da amostra padrão ou de controle de qualidade deve ser documentada, incluindo pureza, estabilidade, fonte, número do lote, certificado de análise e data de validade. Existem vários tipos de padrões, como os padrões compêndios da Farmacopeia dos EUA e materiais fornecidos comercialmente obtidos de uma fonte comercial confiável com pureza documentada.

Idealmente, o padrão de controle para alguns instrumentos (por exemplo, espectrômetros de massa) deve ser idêntico ao analito de interesse no ensaio. Frequentemente isso não é possível e uma forma química estabelecida de pureza conhecida pode ser usada.

## 10.0 Especificações de configuração

As especificações podem ser definidas para medições de controle em processo com base nos resultados de ensaios intralaboratoriais ou interlaboratoriais. Há várias abordagens que podem

ser usadas. Por exemplo, os métodos usados como rotina aplicam um intervalo de confiança de 95% às medições de controle em processo ou usam a média  $\pm$  duas ou três vezes o valor do desvio padrão, mas outras abordagens estatísticas também são usadas com frequência. A definição de especificações envolve um equilíbrio entre objetivos diferentes. É importante ter especificações suficientemente rigorosas para excluir dados que indiquem que o ensaio não está funcionando conforme o esperado ou que os dados de uma medição de controle interna do processo estão dentro de um intervalo em que poderia distorcer o resultado da substância de ensaio. Também é importante não definir as especificações de forma tão rígida, o que poderia fazer com que ensaios com dados em um intervalo considerado normal tenham um número excessivamente alto de execuções do ensaio que não atendem às especificações.