

	PRINCÍPIOS DAS BPL E ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	NORMA Nº NIT-DICLA-071	REV. Nº 01
		APROVADA EM JAN/2019	PÁGINA 01/14

SUMÁRIO

- 1 Objetivo
- 2 Campo de Aplicação
- 3 Responsabilidade
- 4 Histórico das Revisões
- 5 Documentos Complementares
- 6 Siglas
- 7 Considerações Gerais

Anexo – Versão Brasileira da Publicação OECD Number 14 - “The Application of the Principles of GLP to *in vitro* Studies” 2004

1 OBJETIVO

Esta Norma estabelece requisitos complementares à NIT-Dicla-035 no que se refere aos princípios das BPL e estudos *in vitro* e será adotada pela Cgcre para reconhecimento da conformidade destas instalações aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se à Cgcre, aos inspetores e às instalações de teste que possuem ou pretendem obter o reconhecimento da conformidade aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL, com foco em estudos *in vitro*.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela revisão desta Norma é da Dicla.

4 HISTÓRICO DAS REVISÕES

Revisão	Data	Itens revisados
1	JAN/2019	- O documento foi revisado integralmente

5 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

NIE-Cgcre-020	Elaboração de Documentos do Sistema de Gestão da Cgcre
NIT-Dicla-035	Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL



6 SIGLAS

BPL	Boas Práticas de Laboratório
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
Dicla	Divisão de Credenciamento de Laboratórios
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
GQ	Garantia da Qualidade
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
NIT	Norma Inmetro Técnica
OCDE	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
POP	Procedimento Operacional Padrão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

7.1 Os Princípios das Boas Práticas de Laboratório são aplicados às instalações de teste que realizam estudos exigidos por órgãos regulamentadores para o registro de produtos agrotóxicos, farmacêuticos, aditivos de alimentos e rações, cosméticos, veterinários, produtos químicos industriais, organismos geneticamente modificados – OGM, visando avaliar o risco ambiental e a saúde humana dos mesmos.

7.2 A Cgcre se utilizou do documento “*The application of the principles of GLP to in vitro studies*” publicado pela OCDE para traduzir e publicar essa norma.

7.3 Esta norma visa estabelecer diretrizes específicas à aplicação e interpretação dos princípios das Boas Práticas de Laboratório para estudos *in vitro*.

	NIT-DICLA-071	REV. 01	PÁGINA 3/14
---	---------------	------------	----------------

ANEXO
VERSÃO BRASILEIRA DA PUBLICAÇÃO OECD NUMBER 14
“THE APPLICATION OF THE PRINCIPLES OF GLP TO IN VITRO STUDIES”. 2004

Nota: Por tratar-se de tradução de documento em língua estrangeira, este documento não segue as prescrições da NIE-Cgcre-020.

Publicações da OCDE sobre Meio Ambiente, Saúde e Segurança

Série sobre Princípios de Boas Práticas de Laboratório e Monitoramento da Conformidade

No. 14

Documento Consultivo do Grupo de Trabalho sobre BPL

Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos *in vitro*



Prefácio

Com a intensificação dos esforços para diminuir o uso de animais em testes de segurança, os métodos *in vitro* ganham um papel mais proeminente como alternativa ou complemento aos testes de segurança *in vivo*. Espera-se que os avanços previstos nas áreas de toxicogenômica, toxicoproteômica, toxicometabonômica e em diversas técnicas de triagem de alto rendimento reforcem a importância das metodologias *in vitro* para os testes de segurança, além de seu uso tradicional como sistemas testes na área de testes de toxicidade genética. Portanto, o Grupo de Trabalho da OCDE sobre Boas Práticas de Laboratório considerou válido desenvolver uma diretriz adicional, de relevância específica à aplicação e à interpretação dos Princípios de BPL da OCDE para estudos *in vitro*.

O Grupo de Trabalho estabeleceu uma força-tarefa sob a liderança da Suíça e se reuniu em Bern nos dias 12 e 13 de fevereiro de 2004. Tal força-tarefa foi integrada por membros do Grupo de Trabalho ou especialistas em testes *in vitro* designados por eles para representar países como Bélgica, França, Alemanha, Japão, Holanda, Suíça e Estados Unidos, além da Comissão Europeia.

A minuta do Documento Consultivo, desenvolvida pela força-tarefa, foi examinada pelo Grupo de Trabalho em sua 18ª reunião, no mês de maio de 2004, quando foi alterada e endossada. Por sua vez, em sua 37ª reunião conjunta, o Comitê de Produtos Químicos e o Grupo de Trabalho sobre Produtos Químicos, Agrotóxicos e Biotecnologia endossou o documento e recomendou a publicação sob a autoridade do Secretário-Geral.



APLICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS DE BPL A ESTUDOS *IN VITRO*

Introdução

Estudos envolvendo sistemas testes *in vitro* vêm sendo usados para obter dados sobre a segurança dos produtos químicos em relação à saúde humana e ao meio ambiente. Geralmente, a legislação nacional exige que tais estudos sejam conduzidos de acordo com os princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL). Por tradição, os métodos *in vitro* são usados principalmente na área de testes de toxicidade genética, em que a avaliação dos riscos se baseia, em grande parte, em dados derivados de estudos usando sistemas de teste *in vitro*. Com a intensificação dos esforços para diminuir o uso de animais em testes de segurança, os métodos *in vitro* ganham um papel mais proeminente como alternativa ou complemento aos testes de segurança *in vivo*. Além disso, os avanços nas áreas de genômica, proteômica, metabonomica e em diversas técnicas de triagem de alto rendimento (ex. microarranjos) também reforçaram a importância das metodologias *in vitro* para os testes de segurança.

Os requisitos de planejamento, realização, registro, relato e arquivamento dos estudos de segurança de acordo com os Princípios das Boas Práticas de Laboratório da OCDE (doravante denominados como Princípios das BPL) não diferem para outros tipos de estudo. Portanto, os Princípios das BPL e os documentos complementares descrevem os requisitos e fornecem orientações gerais sobre a realização de todos os estudos não clínicos de saúde e segurança ambiental, incluindo estudos *in vitro*. Para facilitar a aplicação e a interpretação dos Princípios de BPL quanto à situação específica de testes *in vitro*, outros esclarecimentos e orientações foram considerados relevantes.

Objetivo deste documento

O objetivo deste documento é facilitar a aplicação e a interpretação corretas dos Princípios das BPL para a organização e a gestão de estudos *in vitro*. Além disso, o documento visa fornecer orientações para a aplicação adequada dos Princípios das BPL a tais estudos, tanto para as instalações de teste (gerência, GQ, pessoal e diretor de estudos) quanto para as autoridades nacionais de monitoramento da conformidade às BPL.

Este documento pretende fornecer interpretações adicionais aos Princípios, bem como orientações quanto a sua aplicação aos estudos *in vitro* realizados para fins de regulamentação. Ele se organiza de forma a constituir uma referência fácil para os Princípios das BPL seguindo as diferentes partes desses Princípios.

Escopo

Este documento destina-se especificamente à aplicação dos Princípios das BPL a estudos *in vitro* quando da realização de testes não clínicos de segurança de itens de testes contidos em produtos farmacêuticos, agrotóxicos, cosméticos e medicamentos veterinários, bem como em aditivos alimentares, aditivos de rações e produtos químicos industriais. Geralmente esses itens de testes são produtos químicos sintéticos, mas podem ter origem natural ou biológica e, em alguns casos, ser organismos vivos. O objetivo de testar essas substâncias é obter dados sobre suas propriedades e/ou segurança com relação à saúde humana e/ou ao ambiente.

A menos que especificamente isentos pela legislação nacional, os Princípios das Boas Práticas de Laboratório aplicam-se a todos os estudos não clínicos de segurança à saúde e ao meio ambiente exigidos pelos órgãos regulamentadores para fins de registro ou licenciamento de produtos farmacêuticos, agrotóxicos, aditivos de alimentos e rações, cosméticos, medicamentos veterinários e produtos similares, além da regulamentação de produtos químicos industriais.



Definições

a) Estudos *in vitro*

Estudos *in vitro* são estudos que não usam organismos multicelulares completos, mas micro-organismos ou material isolado de tais organismos completos ou simulações deles como sistemas teste.

Muitos estudos *in vitro* podem ser qualificados como estudos de curta duração, conforme a definição fornecida pelos Princípios das BPL. Para esses estudos, convém consultar e usar o documento *Aplicação dos Princípios das BPL a Estudos de Curta Duração*, para permitir a aplicação dos requisitos inerentes ao trabalho do diretor de estudo e do setor de Garantia da Qualidade.

b) Item de referência

Em muitos casos, os guias de testes envolvendo estudos *in vitro* exigem o uso de controle positivos, negativos e/ou veículo apropriados. No entanto, tais controles podem não corresponder à definição das BPL para "itens de referência" quanto ao grau de resposta do sistema-teste para o item de teste, mas sim quanto ao desempenho do sistema-teste. Já que o objetivo desses itens de controle positivos, negativos e/ou do veículo pode ser considerado análogo ao objetivo de um item de referência, a definição deste último pode ser considerada com abrangência também aos termos "itens de controle positivos, negativos e/ou do veículo". Contudo, a extensão em que eles devem ser caracterizados analiticamente pode diferir dos requisitos dos itens de referência.

Responsabilidades

a) Gerência da instalação de teste

A maior parte das responsabilidades da gerência da instalação de teste é de caráter geral, sendo igualmente aplicável aos estudos *in vivo* e *in vitro*. Como exemplo, há o requisito de que a gerência da instalação de teste deve assegurar a disponibilidade de pessoal qualificado e instalações/equipamentos adequados para a correta realização do estudo.

No entanto, convém à gerência da instalação de teste saber que os testes *in vitro* poderão influenciar em algumas responsabilidades: por exemplo, a gerência deve assegurar que o pessoal compreenda claramente as funções a serem desempenhadas. Para estudos *in vitro*, esse aspecto pode incluir a garantia de treinamento específico em procedimentos de assepsia e na manipulação de materiais com riscos biológicos. Os testes *in vitro* também podem necessitar da disponibilidade de áreas especializadas e da implementação de procedimentos que evitem a contaminação dos sistemas teste. Outro exemplo é a exigência de que a gerência da instalação de teste garanta que os suprimentos atendam aos requisitos adequados ao uso em um estudo. Certos estudos *in vitro* podem exigir o uso de materiais patenteados ou kits de teste. Embora o documento *Fornecedores e BPL* declare que os materiais a serem usados em um estudo em conformidade às BPL devem ser produzidos e testados com um sistema de qualidade apropriado que avalie sua adequação, imputando a responsabilidade primária pela adequação ao fabricante ou fornecedor, cabe à gerência da instalação de teste confirmar o devido cumprimento de tais condições pela avaliação das práticas, procedimentos e políticas relacionados aos fornecedores.

b) Diretor de Estudo

As responsabilidades gerais do diretor de estudo independem do tipo de estudo e as responsabilidades mencionadas nos Princípios também se aplicam a estudos *in vitro*. O diretor de estudo continua a ser o único ponto de controle do estudo, assumindo a responsabilidade pela realização e pelo relato geral do estudo.



Nos estudos *in vitro*, convém ao diretor de estudo dedicar atenção especial à documentação da justificativa e da caracterização do sistema teste. Tal atividade pode ser mais desafiadora nos estudos *in vitro*. Consulte a seção abaixo sobre sistemas teste, que aborda a documentação necessária para justificar e caracterizar o sistema teste. Nos estudos *in vivo*, essas atividades costumam ser simples. Por exemplo, o uso de uma determinada espécie pode ser justificado pela documentação das características que a tornam um modelo adequado para avaliar o efeito de interesse. A caracterização de um animal em particular pode ser realizada pela simples documentação relativa a espécies, linhagem, sublinhagem, fonte fornecedora, número, faixa de peso corporal, sexo e idade.

Essas atividades necessárias podem ser mais desafiadoras em estudos *in vitro*.

A justificativa do sistema teste pode exigir que o diretor de estudo documente a validação do método de teste ou que tal método é estrutural, funcional e/ou mecanicamente semelhante a um método padronizado. Antes de usar novo método semelhante a um método de teste padronizado, convém ao diretor de estudo fornecer evidência documentada de que o novo método de teste apresenta desempenho comparável quando avaliado com itens de referência adequados.

Documentar as características dos sistemas *in vitro* também pode ser complicado. Embora o diretor de estudo possa documentar algumas características do sistema-teste com a ajuda do fornecedor (ex. linhagem celular, idade/passagem, origem), ele também deve caracterizar o sistema-teste, através de documentos, que este fornece o desempenho exigido ao ser avaliado com itens de referência adequados, incluindo controles positivos, negativos, não tratados e/ou do veículo, quando necessário. Um exemplo de caso especial é o uso de materiais patenteados ou kits de teste na realização de estudos *in vitro*. Embora convenha ao fornecedor, produtor ou detentor da patente assegurar o desempenho de tais materiais ou kits de teste, e embora a gerência da instalação de teste seja responsável por garantir que o fornecedor atenda aos critérios de qualidade conforme mencionado (por exemplo, ao avaliar as práticas, procedimentos e políticas do fornecedor), cabe ao diretor de estudo assegurar que o desempenho desses materiais ou kits atenda de fato aos requisitos do estudo, bem como garantir a adequação e a devida validação dos kits de teste para sua finalidade. Como a qualidade e a confiabilidade dos resultados do estudo serão influenciados diretamente pela qualidade e pelo desempenho desses materiais ou kits de teste, é extremamente importante que o diretor de estudo examine com cuidado e avalie criticamente a integridade e a aceitabilidade da documentação referente ao controle da qualidade apresentada pelo fornecedor. O diretor de estudo deve, no mínimo, estar apto a julgar a adequação do sistema da qualidade usado pelo fabricante, devendo também dispor de toda a documentação necessária para avaliar o uso adequado do sistema teste (por exemplo, resultados dos testes de desempenho).

c) Pessoal de estudo

Quando aplicável, o pessoal deve observar cuidadosamente os requisitos para as condições de assepsia e seguir os respectivos procedimentos na realização de estudos *in vitro* para evitar a contaminação por patógeno ao sistema teste. Da mesma forma, o pessoal deve empregar práticas adequadas para evitar a contaminação cruzada entre os sistemas testes e garantir a integridade do estudo. O pessoal do estudo deve conhecer e respeitar estritamente as exigências para isolar os sistemas testes e estudos envolvendo materiais que apresentem riscos biológicos. Durante os estudos *in vitro*, também deve haver precauções adequadas para minimizar os riscos provenientes do uso de produtos químicos perigosos.

Garantia da qualidade

Em geral, as atividades de Garantia da Qualidade (GQ) não diferem muito entre estudos *in vitro* e *in vivo*. Há casos em que os estudos *in vitro* podem ser realizados dentro das condições de estudos de curta duração. Nesses casos, é necessário usar o documento *Aplicação dos Princípios das BPL a Estudos de Curta Duração*. Assim, tais estudos poderão ser inspecionados pela GQ, se aplicável e permitido pelos órgãos regulamentadores nacionais, conforme a inspeção



baseada em processo. Como os Princípios de BPL exigem que a GQ inspecione especialmente as fases críticas de um estudo, é importante que, no caso dos estudos *in vitro*, a GQ esteja ciente do que constitui as fases críticas (e aspectos críticos) de tais estudos. Convém desenvolver procedimentos orientativos correspondentes às inspeções da GQ em cooperação com os diretores de estudo, pesquisadores principais e pessoal de estudo nas áreas relevantes. Já que o programa de GQ deve abranger explicitamente aspectos específicos de testes *in vitro* sempre que indicado, a formação e o treinamento do pessoal da GQ também devem ser explicitamente direcionados à capacidade de reconhecer possíveis problemas em áreas específicas de testes *in vitro*.

As áreas específicas a serem inspecionadas poderão incluir, mas não se limitar, aos procedimentos e medidas para:

- monitorar os lotes de componentes dos meios de cultura de células e tecidos que são críticos para o desempenho do sistema teste (por exemplo, soro fetal bovino, etc.) e outros materiais com relação a sua influência no desempenho do sistema teste;
- avaliar e garantir a condição (e a integridade) funcional e/ou morfológica de células, tecidos e outros materiais indicadores;
- monitorar a possível contaminação por células estranhas, micoplasma e outros patógenos ou agentes adventícios, conforme o caso;
- limpar e descontaminar as instalações e equipamentos, minimizando fontes de contaminação de item de teste e sistemas teste;
- garantir que os equipamentos especializados sejam adequadamente usados e recebam manutenção adequada;
- garantir a criopreservação e a reconstituição adequadas de células e tecidos;
- garantir condições adequadas para a recuperação de materiais de armazenamento congelado;
- garantir a esterilidade de materiais e insumos usados para culturas de células e tecidos;
- manter a separação adequada entre os diferentes estudos e sistemas teste.

Instalações

a) Geral

Os Princípios das BPL determinam que as instalações de teste sejam adequadas para atender aos requisitos dos estudos nelas executados, além de estipularem um nível adequado de separação entre as diferentes atividades para garantir a realização apropriada de cada estudo. Como os estudos *in vitro*, em geral, ocupam um espaço limitado e normalmente não requerem instalações específicas que excluam a realização de outros estudos, convém tomar medidas para garantir a separação adequada de estudos *in vitro* coexistentes em um ambiente físico.

b) Instalações de sistema teste

Os Princípios das BPL exigem a disponibilidade de um número suficiente de salas ou áreas para garantir o isolamento dos sistemas teste; tais áreas devem ser adequadas para garantir a minimização da probabilidade de contaminação dos sistemas teste. Entretanto, o termo "áreas" não é definido especificamente, e sua interpretação é adaptável a diferentes situações *in vitro*. Considerando a questão, o mais importante é evitar que a possibilidade de contaminação, contaminação cruzada ou mistura comprometa a integridade de cada sistema teste e estudo.

Com isso, pode ser possível armazenar células ou tecidos pertencentes a diferentes estudos na mesma incubadora, desde que haja um grau adequado de separação (por exemplo, identificadores adequados, etiquetagem ou disposição separada para distinguir os estudos, etc.) e que nenhum item de teste seja volátil o bastante para contaminar outros estudos em andamento na mesma incubadora.



A separação das fases críticas do estudo pode acontecer não somente no âmbito do espaço, mas também do tempo. A manipulação de culturas de células e tecidos, como procedimentos de subcultura, adição do item de teste, etc., normalmente é realizada em cabine de fluxo laminar vertical para garantir a esterilidade e proteger o sistema teste, bem como o pessoal do estudo e o ambiente. Nessas circunstâncias, a separação adequada para evitar contaminação cruzada entre os diferentes estudos será alcançada pela manipulação sequencial dos sistemas-teste usados nos estudos individuais, com limpeza e descontaminação/esterilização cuidadosas das superfícies de trabalho da cabine e dos equipamentos de laboratório pertinentes entre as diferentes atividades, conforme necessário.

Outro aspecto importante é a disponibilidade de salas ou áreas dedicadas com equipamentos especiais para o armazenamento de longa duração dos sistemas teste. Os equipamentos, incluindo os recipientes de armazenamento, devem proporcionar condições adequadas para a manutenção da integridade de longa duração dos sistemas teste.

c) Instalações para manuseio de itens de teste e itens de referência

Embora os requisitos dos Princípios das BPL para o manuseio de itens de teste e itens de referência se apliquem igualmente a testes *in vitro* quanto à prevenção de contaminação cruzada, outro aspecto deve ser considerado: uma vez que a esterilidade é uma questão importante em estudos *in vitro*, convém assegurar que as salas ou áreas usadas para preparação e mistura de itens de teste e itens de referência com veículos sejam equipadas de modo a permitir o trabalho sob condições assépticas, protegendo o sistema teste/estudo e minimizando a probabilidade de contaminação pela preparação de itens de teste e itens de referência.

Equipamentos, materiais e reagentes

Embora os requisitos de rotina comumente observados para equipamentos usados em ambientes em conformidade com as BPL se apliquem do mesmo modo aos equipamentos usados para estudos *in vitro*, há pontos e questões específicas importantes. Por exemplo, para assegurar a integridade e a confiabilidade de estudos *in vitro*, é importante garantir a manutenção, o monitoramento e a calibração regulares das condições adequadas de determinados equipamentos, como microbalanças, micropipetas, cabines de fluxo laminar de ar ou incubadoras. Para equipamentos específicos, convém identificar os parâmetros críticos que exigem monitoramento contínuo ou fixação de valores-limite, além da instalação de alarmes.

Os requisitos dos Princípios de BPL para reagentes quanto à rotulagem e datas de validade aplicam-se igualmente aos usados para estudos *in vitro*.

Sistemas teste

Sistemas teste *in vitro* são essencialmente sistemas biológicos, embora alguns dos testes convencionais *in vivo* (como matrizes genéticas para ensaios toxicogenômicos) também possam apresentar alguns atributos de sistemas testes físico-químicos, enquanto outros, como testes metabonômicos aplicados à toxicologia, podem basear-se principalmente na metodologia analítica. Os kits de teste, incluindo kits patenteados de teste, também devem ser considerados como sistemas teste.

a) Condições para sistemas teste

Assim como em qualquer outro sistema teste biológico, convém definir, manter e monitorar condições adequadas para garantir a qualidade e a integridade do sistema teste durante o armazenamento e dentro do próprio estudo. Isso inclui a definição, a manutenção e o monitoramento documentados sobre a viabilidade e a capacidade de resposta do sistema teste, incluindo o registro do número de passagens das células e tempos de duplicação da população.



Além disso, convém manter os registros das condições ambientais (ex. o nível de nitrogênio líquido em um sistema de armazenamento à baixa temperatura com nitrogênio líquido, temperatura, umidade e concentração de CO₂ em incubadoras, etc.), bem como de qualquer manipulação do sistema teste necessária para a manutenção de sua qualidade e integridade (ex. o tratamento com antibióticos ou antifúngicos, subcultura ou cultura seletiva para reduzir a frequência de eventos espontâneos). Como a manutenção de condições ambientais adequadas durante o armazenamento dos sistemas teste pode influenciar a qualidade dos dados em maior grau do que para outros sistemas biológicos, esses registros podem ser de importância especial na manutenção da qualidade e confiabilidade dos dados.

b) Sistemas teste recém recebidos

Convém analisar e manter nos registros do estudo a documentação obtida pelo fornecedor de sistemas teste *in vitro* (como a origem, idade/número de passagens, tempo de duplicação celular e outras características relevantes que ajudem a identificar o sistema teste). Critérios predefinidos devem ser usados para avaliar viabilidade, adequação (ex. condição funcional e/ou morfológica das células e tecidos, testes para contaminantes microbianos ou virais conhecidos ou suspeitos) e capacidade de resposta do sistema teste. Os resultados dessas avaliações devem ser documentados e mantidos nos registros do estudo. Se tal avaliação não for possível (por exemplo, com culturas de células primárias ou "órgãos reconstituídos"), convém haver um mecanismo entre o fornecedor e o usuário para verificar e documentar a adequação do sistema teste. O monitoramento e o registro do desempenho contra itens de controle positivos e negativos podem constituir prova suficiente para determinar a capacidade de resposta de um determinado sistema teste. Qualquer problema com o sistema teste que possa afetar a qualidade, validade e confiabilidade do estudo deve ser documentado e discutido no relatório final. Convém levar ao conhecimento do fornecedor os problemas com sistemas teste fornecidos para que haja ações corretivas.

c) Registros dos sistemas teste

Os Princípios de BPL exigem a manutenção de registros de origem, data de chegada e condição de chegada de sistemas teste; para células e tecidos, esses registros devem incluir não apenas a fonte imediata (como fornecedor comercial), mas também a fonte original de obtenção das células ou os tecidos (ex. células ou tecidos primários com características do doador; linhagens celulares estabelecidas a partir de fontes reconhecidas, etc.). As informações a serem mantidas também podem incluir, entre outras, o método de obtenção original das células ou tecidos (ex. explantes de tecidos, biópsias de tecidos normais ou cancerígenos, transferência de genes por transfecção do plasmídeo ou transdução de vírus, etc.), a cronologia de custódia, o número de passagens de linhagens celulares, condições de cultura e intervalos de subcultura, condições de congelamento/descongelamento, etc. Além disso, para os sistemas teste de transgênicos, é necessário verificar a natureza do transgene e monitorar a manutenção da expressão com controles adequados.

É necessário dar atenção especial à rotulagem adequada dos sistemas teste durante o armazenamento e o uso, o que inclui medidas para garantir a durabilidade da rotulagem.

Sempre deve haver medidas para garantir a identificação correta de sistemas teste, principalmente quando o tamanho dos recipientes e as condições de armazenamento (por exemplo, tubos de congelamento em nitrogênio líquido, sistemas teste múltiplos armazenados em um recipiente) são fatores críticos para a rotulagem.

Os requisitos relacionados aos Princípios das BPL para itens de teste e reagentes com relação à rotulagem e datas de validade aplicam-se igualmente aos kits de teste usados como sistemas teste *in vitro*. Deve haver uma data de validade para os kits de teste, se usados como sistemas teste ou de qualquer outra forma para fins de análise, por exemplo. A extensão dessa data de validade pode ser aceitável somente com base em uma avaliação (ou análise) documentada. Para os kits de teste usados como sistemas teste, a avaliação documentada pode consistir no



registro histórico das respostas observadas, obtido com o respectivo lote do kit de teste para itens de controle positivos, negativos e/ou do veículo, além da prova de que, mesmo após a data de validade, a resposta não se afastou dos valores históricos de controle. Uma decisão documentada do diretor de estudo quanto à prorrogação da data de validade deve apresentar evidências para o processo de avaliação.

Para evitar possíveis confusões, a nomenclatura dos sistemas teste deve ser claramente definida, e seus rótulos (assim como todos os registros obtidos a partir de estudos individuais) devem conter a designação de uma aceitação formal do sistema teste.

Itens de teste e de referência (incluindo itens de controle negativos e positivos)

Em geral, não há requisitos específicos para recepção, manuseio, amostragem, armazenamento e caracterização de itens de teste e de referência empregados em estudos que usam sistemas teste *in vitro*, além dos listados nos Princípios de BPL. Todavia, pode haver exigências quanto às condições assépticas no tratamento para evitar a contaminação microbiana de sistemas teste.

Para itens de controle negativos, positivos e de veículo, talvez seja necessário determinar a concentração e a homogeneidade, uma vez que pode ser suficiente fornecer evidências para a resposta correta esperada do sistema teste.

A data de validade desses itens de controle também pode ser prorrogada por avaliação ou análise documentada.

Essa avaliação pode consistir em evidências documentadas de que a resposta dos respectivos sistemas teste para esses itens de controle positivos, negativos e/ou do veículo não se afasta dos valores históricos de controle registrados na instalação de teste, que deve ser comparável aos valores de referência publicados.

Procedimentos Operacionais Padrão (POP)

Além dos exemplos citados no documento Princípios das BPL (veja seção 7.4.1 – 7.4.5), algumas atividades e processos específicos para testes *in vitro* devem ser descritos em Procedimentos Operacionais Padrão. Portanto, os POP devem estar disponíveis, entre outros, para os exemplos ilustrativos, a seguir, quanto às atividades da instalação de teste relacionadas com testes *in vitro*.

a) Instalações

Monitoramento ambiental quanto aos agentes patogênicos no ar e em superfícies, limpeza e desinfecção, procedimentos em caso de infecção ou contaminação nas instalações ou áreas de teste.

b) Equipamentos

Uso, manutenção, monitoramento de desempenho, limpeza e descontaminação de equipamentos e instrumentos de cultura de células e tecidos, como cabines de fluxo laminar e incubadoras; monitoramento dos níveis de nitrogênio líquido em recipientes de armazenamento, calibração e monitoramento da temperatura, umidade e níveis de CO₂ em incubadoras.

c) Materiais, reagentes e soluções

Avaliação da adequação, extensão de datas de validade, análise e manutenção da esterilidade, triagem dos contaminantes patogênicos comuns; descrição dos procedimentos de seleção e uso dos veículos; procedimentos de verificação de compatibilidade dos veículos com o sistema teste.



d) Sistemas teste

Condições de armazenamento e procedimentos de congelamento e descongelamento de células e tecidos, testes de patógenos comuns; inspeção visual de contaminações; procedimentos de verificação (ex. uso de critérios de aceitação) para garantir as propriedades e a responsividade na chegada e durante o uso, imediatamente após a chegada ou após armazenamento, avaliação morfológica, controle da estabilidade do fenótipo ou do cariótipo, controle de estabilidade do transgene; modo de início de cultura, condições de cultura com intervalos de subcultivo; manuseio de materiais que apresentam risco biológico e dos sistemas teste; procedimentos para o descarte dos sistemas teste.

e) Desempenho do estudo

Técnicas assépticas, critérios de aceitação para a validade do estudo, critérios de repetições da análise.

f) Garantia da qualidade

Definição das fases críticas, frequências de inspeção.

Desempenho e Relatório de Resultados do Estudo

Os requisitos relacionados aos princípios das BPL para a realização de estudos *in vitro* são idênticos aos previstos para os estudos mais convencionais de segurança. Em muitos casos, o documento *Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração* pode ser consultado em combinação com o documento Princípios das BPL para realizar os estudos *in vitro* em conformidade com as BPL.

Há uma série de questões específicas a testes *in vitro* que deveriam ser contempladas no plano de estudo, bem como no relatório final do estudo. Entretanto, tais questões têm natureza essencialmente científica e técnica, como o requisito científico de que os controles internos (controles adequados positivos, negativos, não tratados e/ou de veículos), realizados para controle de desvios e avaliação do desempenho do sistema teste, deveriam ser realizados concomitantemente com o item de teste em todos os estudos *in vitro*. Há orientações mais específicas quanto aos tópicos a serem considerados no plano de estudo e no relatório final nos respectivos guias da OCDE ou em outras referências apropriadas.

Armazenamento e retenção de registros e materiais

Os requisitos gerais relacionados à retenção estabelecidos no documento Princípios das BPL são igualmente aplicáveis a estudos *in vitro*. Além disso, deve-se considerar a retenção de amostras de sistemas teste que necessitam ser conservadas em longa duração, principalmente sistemas teste de disponibilidade limitada (como subclones especiais de linhagens de células, células transgênicas, etc) para permitir a confirmação da identidade do sistema teste e/ou para reconstruir o estudo.

Também deve ser considerada a retenção de amostras dos itens de teste para os estudos *in vitro* que possam ser categorizados como estudos de curta duração, especialmente nos casos em que os estudos *in vitro* constituam grande parte dos estudos de segurança.

Os registros dos resultados históricos positivos, negativos, não tratados e/ou de controle do veículo usados para estabelecer a faixa de resposta aceitável do sistema teste também devem ser mantidos.



Glossário de termos

No contexto deste documento, entende-se por:

Condições assépticas: condições propiciadas e existentes no ambiente de trabalho em que o potencial para contaminação microbiana e/ou viral é minimizado.

Linhagens de células: células que sofreram uma alteração genética para a imortalização e que conseqüentemente podem se multiplicar por períodos prolongados *in vitro*, e podem ser expandidas e criopreservadas como depósitos de banco de células. Em geral, uma linhagem celular contínua é mais homogênea, mais estável e, portanto, mais reprodutível do que uma população heterogênea de células primárias.

Controle negativo: parte separada de um sistema teste tratado com uma substância para a qual se sabe que o sistema teste não deveria responder; o controle negativo fornece evidência de que o sistema teste não é suscetível sob as condições reais do teste.

Controle positivo: parte separada do sistema teste tratado com uma substância para a qual se sabe a resposta para o sistema teste; o controle positivo fornece evidência de que o sistema teste é suscetível sob as condições reais do teste.

Controle não tratado: parte separada, não tratada, de um sistema teste que é mantida sob as condições originais da cultura; o controle não tratado fornece dados da linha de base do sistema teste, nas condições do teste.

Controle do veículo: parte separada de um sistema teste na qual se adiciona o veículo para o item de teste; o controle do veículo fornece evidência de que o veículo escolhido não influencia o sistema teste nas condições reais do teste.

Fases críticas: procedimentos ou atividades individuais definidas dentro de um estudo sobre a correta execução, da qual a qualidade do estudo, a validade e a confiabilidade são extremamente dependentes.

Contaminação cruzada: contaminação de um item de teste ou de um sistema teste por outro item de teste ou por outro sistema teste introduzido inadvertidamente, contaminando o item de teste ou prejudicando o sistema teste.

Criopreservação: armazenamento de células e tecidos pelo congelamento nas condições em que a viabilidade é conservada.

Tubo de congelamento: frascos especiais usados para a criopreservação. Um tubo de congelamento deve satisfazer condições especiais, como estanqueidade da tampa, mesmo em temperaturas extremamente baixas e em mudanças extremas de temperatura durante o congelamento e descongelamento.

Ex vivo: células, tecidos ou órgãos removidos de animais intactos para análise posterior.

Transfecção de genes: introdução de DNA estranho e complementar (genes únicos ou múltiplos) em uma célula hospedeira.

Triagem de alto rendimento: uso de tecnologia miniaturizada com base em robótica para triagem de grandes bibliotecas de compostos contendo genes, proteínas, células, tecidos, etc., isolados para selecionar compostos com base em atividades específicas de desenvolvimento futuro.

Micromatrizes: conjuntos de áreas miniaturizadas de reações químicas dispostas de forma ordenada e depositadas em uma matriz sólida, como uma lâmina de microscópio. Uma



micromatriz de DNA fornece um meio para combinar amostras de DNA conhecido e desconhecido baseando-se em regras de emparelhamento de bases, e permite a automação do processo de identificação de amostras de DNA desconhecido para uso em investigação de uma amostra biológica a fim de determinar a expressão do gene, padrão de marcador ou sequência de nucleotídeos do DNA/RNA.

Células primárias: células recém-isoladas de origem animal ou vegetal. Células primárias recém-isoladas poderão rapidamente se diferenciar na cultura e, em geral, têm duração limitada. Culturas primárias isoladas de animais ou seres humanos poderão representar populações heterogêneas, por exemplo, quanto a diferenças em tipos de células e estados de diferenciação em função das técnicas de purificação usadas. Cada isolado será único e impossível de reproduzir exatamente. Culturas de células primárias normalmente exigem meios de nutrientes complexos, suplementados com soro e outros componentes. Conseqüentemente, os sistemas de cultura de células primárias são extremamente difíceis de padronizar.

Material registrado: material protegido por (patente, direito autoral ou marca registrada) leis contra uso ilícito.

Kit de teste: compilação pronta para uso de todos os componentes necessários para a realização de um ensaio, teste ou estudo.

Tecidos: agregados multicelulares de células diferenciadas com função específica como constituintes de organismos.

Toxicogenômica: estudo de como os genomas respondem aos estímulos ambientais ou de substâncias tóxicas. O objetivo da toxicogenômica é encontrar correlações entre as respostas a substâncias tóxicas e mudanças nos perfis genéticos dos objetos expostos a tais substâncias tóxicas. A toxicogenômica combina as tecnologias emergentes da genômica e da bioinformática para identificar e caracterizar os mecanismos de ação de substâncias tóxicas conhecidas e duvidosas. Atualmente, as principais ferramentas toxicogenômicas são a micromatriz de DNA e o chip de DNA, usadas para o monitoramento simultâneo dos níveis de expressão de centenas de milhares de genes.

Toxicometabonômica: medição quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica referente ao tempo de sistemas vivos aos estímulos fisiopatológicos ou à modificação genética pela exploração sistemática da composição de fluidos biológicos por RMN / tecnologia de reconhecimento de padrões, a fim de associar a toxicidade em órgãos-alvo a padrões espectrais de RMN e identificar novos marcadores substitutos de toxicidade.

Toxicoproteômica: estudo de como a expressão global da proteína em uma célula ou tecido responde aos estímulos ambientais ou de substâncias tóxicas. O objetivo da proteômica aplicada à toxicologia é encontrar correlações entre as respostas a substâncias tóxicas e mudanças nos complementos completos de perfis proteicos dos objetos expostos a tais substâncias tóxicas.

Células transgênicas: células transfectadas com um ou mais genes estranhos que conseqüentemente expressam características e funções em geral ausentes na célula parental ou presentes apenas em baixos níveis de expressão.

Fontes para mais informações sobre testes *in vitro*

1. Boas práticas de culturas celulares - <http://ecvam.jrc.it/publication/index5007.html>
2. Diretriz MIAME - <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>
3. ECVAM - <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
4. ICCVAM - <http://iccvam.niehs.nih.gov/>