II

(Atos não legislativos)

REGULAMENTOS

REGULAMENTO (UE) N.º 640/2012 DA COMISSÃO

de 6 de julho de 2012

que altera, tendo em vista a adaptação ao progresso técnico, o Regulamento (CE) n.º 440/2008 que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH)

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Diretiva 1999/45/CE e revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Diretiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão [1], nomeadamente o artigo 13.º, n.º 3,

Considerando o seguinte:

(1) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão [2] estabelece os métodos de ensaio a aplicar para os fins do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, com vista à determinação das propriedades físico-químicas, da toxicidade e da ecotoxicidade das substâncias.

(2) A fim de reduzir o número de animais utilizados para fins experimentais, em conformidade com a Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos [3], e com a Diretiva 86/609/CEE do Conselho, de 24 de novembro de 1986, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos [4], é necessário atualizar o Regulamento (CE) n.º 440/2008 a fim de nele incluir, com caráter prioritário, determinados métodos de ensaio alternativos, atualizados e novos, adotados recentemente pela OCDE. Consultaram-se as partes interessadas sobre o projeto.

(3) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 deve, portanto, ser alterado em conformidade.

(4) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do comité instituído pelo artigo 133.º do Regulamento (CE) n.º 1907/2006,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo do Regulamento (CE) n.º 440/2008 é alterado em conformidade com o anexo do presente regulamento.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

[1] JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.
[2] JO L 142 de 31.5.2008, p. 1.
[3] JO L 276 de 20.10.2010, p. 33.
[4] JO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e diretamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 6 de julho de 2012.

Pela Comissão

O Presidente

José MANUEL BARROSO

ANEXO

O anexo do Regulamento (CE) n.º 440/2008 é alterado do seguinte modo:

1. O capítulo B.42 passa a ter a seguinte redação:

«**B.42. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS**

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE nelas baseados são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. Foi adotada anteriormente a versão original do método de ensaio de gânglios linfáticos locais para determinação da sensibilização cutânea no rato (método LLNA, de "*Local Lymph Node Assay*", *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) (1). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) elementos pormenorizados sobre a validação do referido método, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. Com base na avaliação da experiência adquirida e dos dados científicos, procedeu-se à atualização do método LLNA (12). O presente ensaio é o segundo método concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O outro método (*Test Guideline* 406 da OCDE, capítulo B.6 deste anexo) recorre a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (13). No que respeita ao bem-estar animal, o método LLNA é melhor do que o método B.6 e o *Test Guideline* 406 da OCDE (13). O presente método LLNA atualizado inclui uma série de normas de desempenho (apêndice 1), que podem ser utilizadas como elemento de validação de métodos de ensaio novos ou modificados, funcional e mecanisticamente similares ao método LLNA, em conformidade com os princípios do documento de orientação (*Guidance Document*) n.º 34 da OCDE (14).

2. O método LLNA estuda a fase de indução da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Note-se que os sensibilizantes ligeiros/moderados recomendados como produtos químicos de controlo positivo adequados para métodos de ensaio em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13) também o são para o método LLNA (6) (8) (15). Neste método descreve-se, como possibilidade alternativa, uma abordagem LLNA reduzida (método rLLNA) que permite diminuir o número de animais utilizados numa percentagem que pode ir até 40 % (16) (17) (18). Pode recorrer-se a este método reduzido quando a regulamentação exigir que seja confirmada uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea, desde que sejam observadas todas as outras especificações do protocolo LLNA aqui descritas. Uma previsão de resultado negativo deve basear-se em todas as informações disponíveis, como se refere no ponto 4. Antes de se recorrer ao método rLLNA, é necessário justificar claramente e fundamentar cientificamente a utilização do método. Se, contrariamente ao esperado, o método rLLNA der resultados positivos ou inconclusivos, pode ser necessário efetuar mais ensaios para interpretar ou clarificar os resultados obtidos. O método rLLNA não deve ser utilizado em estudos de identificação de perigos associados a substâncias sensibilizantes da pele quando forem necessárias informações de resposta à dosagem, como na subcategorização para efeitos do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, e do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU.

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 2.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA constitui um método alternativo a utilizar na identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele. Isso não implica, necessariamente, que o método deve ser sempre utilizado em substituição de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação. Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA se adequa à substância (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o número de animais utilizados para estes fins. Além disso, proporciona melhorias substanciais (menos dor e sofrimento) no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto. O método LLNA baseia-se na observação de ocorrências imunológicas estimuladas por produtos químicos durante a fase indutora da sensibilização. Contrariamente aos ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Também não implica a utilização de nenhum adjuvante, ao contrário do que sucede no ensaio de maximização na cobaia (13), reduzindo assim a dor e sofrimento causados aos animais. Apesar das vantagens do método LLNA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE, importa reconhecer que o método tem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos (13) (por exemplo,

falsos negativos no método LLNA para certos metais, falsos positivos para certos irritantes cutâneos – como no caso de alguns produtos químicos tensioativos (19) (20) – ou problemas de solubilidade da substância em estudo). Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (21), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias (método B.6; *Test Guideline* 406 da OCDE) (13). Além disso, tendo em conta a base de dados de validação – limitada e essencialmente constituída por formulações pesticidas –, é mais provável que o método LLNA dê resultados positivos para este tipo de substância em estudo do que o ensaio na cobaia (22). Todavia, ao testar formulações, pode encarar-se a possibilidade de incluir, como substâncias de referência, substâncias similares com resultados conhecidos, para demonstrar que o método LLNA funciona bem (ver o ponto 16). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA é potencialmente aplicável ao estudo de qualquer substância, a menos que esta possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; essa razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 3. O presente método baseia-se no recurso à marcação radioativa *in vivo* para medir o aumento de número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular. Podem, no entanto, utilizar-se outros indicadores para determinar o número de células em proliferação, desde que as normas de desempenho sejam totalmente cumpridas (apêndice 1).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Utilizam-se fêmeas adultas das estirpes CBA/Ca ou CBA/J, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e de alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (23), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de executarem o método LLNA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do

qual se espere um aumento do índice de estimulação superior a 3 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 20). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1 e mercaptobenzotiazol (n.º CAS 149-30-4) a 5 % em *N*,*N*-dimetilformamida (ver o apêndice 1, quadro 1). Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (12).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (24). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo,

— características físico-químicas conhecidas,

— dados corroborantes do método LLNA,

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 14). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (3) e (5). Selecionam-se normalmente doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (3) (25). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N*,*N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (19), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 35). Por outro lado, se se dispuser de dados por animal, pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo (12). Além disso, há autoridades reguladoras que exigem a apresentação de dados por animal. Todavia, algumas autoridades reguladoras podem aceitar a agregação de dados relativos a vários animais, caso em que os utentes podem optar por dados individualizados por animal ou pela agregação de dados relativos a séries de animais.

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 6). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (25). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose) e no dia 6. Complementarmente, no dia 6 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais, em qualquer dia de medição, constituem indicadores de irritação cutânea local excessiva (26) (27). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (26) (27), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (30) (32) (33) (34).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (35) (36), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos, ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 6, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem sofrimento ou sinais de dor intensa e continuada devem ser eutanasiados (37).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2 e 3:* Repetir o procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

— *Dias 4 e 5:* Nenhum tratamento.

— *Dia 6:* Anotar o peso de cada animal. Injetar, através da veia caudal, 250 µl de tampão salino de fosfato (PBS) esterilizado contendo 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de ^{3}H-metiltimidina em todos os ratos do estudo e de controlo. Em alternativa, injetar 250 µl de PBS esterilizado, contendo 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-iododesoxiuridina numa concentração 10^{-5} M em fluorodesoxiuridina, em todos os ratos, através da veia caudal. Eutanasiar os animais 5 horas depois. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em PBS, separadamente para cada animal (procedimento por animal); em alternativa, excisar os gânglios linfáticos de cada orelha e colocá-los agrupados em PBS, por grupo de tratamento (procedimento do tratamento agrupado). Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (12). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares, como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos, excisados bilateralmente, aplicando o procedimento por animal ou, em alternativa, o procedimento do tratamento agrupado, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com malha de 200 µm, ou recorrendo a outra técnica aceitável para obtenção de suspensões unicelulares. Lavar duas vezes as células com PBS em excesso e precipitar o ADN com ácido tricloroacético a 5 %, a 4 °C, durante 18 horas (3). Ressuspender os sedimentos em 1 ml de ácido tricloroacético e transferir a suspensão para frascos de contador de cintilações contendo 10 ml de fluido de cintilação, para contagem de ^{3}H, ou diretamente para tubos de contagem gama, para contagem de ^{125}I.

Determinação da proliferação celular (radioatividade incorporada)

27. Medir a incorporação de ^{3}H-metiltimidina por contagem de cintilação β, em desintegrações por minuto (DPM). Medir a incorporação de ^{125}I-iododesoxiuridina por contagem de ^{125}I, exprimindo-a igualmente em DPM. Consoante o procedimento seguido, a incorporação é expressa em DPM/rato (procedimento por animal) ou em DPM/grupo de tratamento (procedimento do tratamento agrupado).

Método LLNA reduzido

28. Em determinadas situações, quando a regulamentação exigir que se confirme uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea, pode recorrer-se a um protocolo rLLNA facultativo (16) (17) (18) que utiliza menos animais, desde que sejam observadas todas as outras especificações do protocolo LLNA aqui descritas. Antes de se recorrer ao método rLLNA, é necessário justificar claramente com base em argumentos científicos a utilização do método. Se forem obtidos resultados positivos ou inconclusivos, pode ser necessário efetuar mais ensaios para interpretar ou clarificar esses resultados.

29. A redução numérica dos grupos de dosagem é a única diferença entre os protocolos de ensaio dos métodos LLNA e rLLNA, razão pela qual este último não permite obter informações de resposta à dosagem. Não deve, portanto, recorrer-se ao método rLLNA quando essas informações forem necessárias. Tal como no método de multidosagem LLNA, no método rLLNA avalia-se a concentração máxima da substância em estudo que não induz toxicidade sistémica manifesta nem irritação cutânea local excessiva no rato (ver o ponto 18).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

30. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (37).

Pesos corporais

31. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

32. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação. Caso se utilize o procedimento por animal, determina-se o índice de estimulação dividindo a média de DPM/rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pela média de DPM/rato do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1. Caso se utilize o tratamento agrupado, determina-se o índice de estimulação dividindo a incorporação radioativa agregada correspondente a cada grupo de tratamento pela incorporação agregada do grupo de controlo do excipiente. O valor obtido é um índice de estimulação médio.

33. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 3. Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (4) (5) (6).

34. Se for necessário clarificar os resultados obtidos, devem examinar-se as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea local excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (7) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

35. A recolha de dados de radioatividade para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartando outros (por vezes denominados "aberrantes").

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

36. Os dados devem ser resumidos em quadros. Quando se seguir o procedimento por animal, indicar os valores de DPM correspondentes a cada animal, a média de DPM/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo. Quando se recorrer ao tratamento agrupado, indicar a média ou a mediana das desintegrações por minuto e o índice de estimulação médio de cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

37. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substâncias em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso das misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio eventualmente efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua morte programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— quadro de valores de DPM e de índices de estimulação para cada grupo de tratamento, por rato (procedimento por animal) ou em valor médio/da mediana (procedimento do tratamento agrupado),

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) de DPM/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento, quando se aplica o procedimento por animal,

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo, quando se aplica o procedimento por animal,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Kimber, I., Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257.

(12) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(13) OCDE (1992). Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A., Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis,* 54, 181-185.

(17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), Direção-Geral da Comissão Europeia, Centro Comum de Investigação, Instituto de Saúde e Proteção dos Consumidores, Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, abril de 2007. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].

(18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH Publication Number 09-6439. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(19) ICCVAM (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No. 99-4494. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. *Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions. NIH Publication Number 10-7512. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(25) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404. Paris, França. Disponível em: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009). Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA//BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European interlaboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) OCDE (1987). Acute Dermal Toxicity. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402. Paris, França. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(36) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(37) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

Apêndice 1

Normas de desempenho para avaliação de métodos similares ou modificados propostos para ensaios LLNA de sensibilização cutânea

INTRODUÇÃO

1. O objetivo das normas de desempenho consiste em comunicar os termos com base nos quais é possível determinar se um método novo, sujeito ou não a direitos de propriedade (direitos de autor, marca comercial ou registo), é suficientemente exato e fiável para certas finalidades de ensaio. Estas normas baseiam-se em métodos de ensaio validados e aceites e podem ser utilizadas para avaliar a fiabilidade e exatidão de métodos similares (designados coloquialmente em inglês por "métodos '*me-too*' "), baseados em princípios científicos semelhantes e que medem ou preveem o mesmo efeito biológico ou tóxico (14).

2. Antes da adoção de métodos modificados (ou seja, aperfeiçoamentos a métodos de ensaio aprovados), deve avaliar-se o efeito das alterações propostas no desempenho do ensaio e em que medida essas alterações afetam as informações disponíveis para os outros componentes do processo de validação. Em função do número e da natureza das alterações propostas, dos dados de que se disponha e da documentação de apoio às alterações em causa, os métodos modificados devem ser sujeitos a um processo de validação idêntico ao descrito para um novo ensaio ou, se for caso disso, a uma avaliação limitada de fiabilidade e adequação com base em normas de desempenho estabelecidas (14).

3. Os métodos similares ou modificados cuja utilização no âmbito do presente método de ensaio seja proposta devem ser avaliados, com vista à determinação da sua fiabilidade e exatidão, utilizando produtos químicos representativos de toda a gama da escala de pontuação do método LLNA. Para evitar que sejam utilizados animais sem necessidade, recomenda-se vivamente que as entidades que desenvolvam os modelos consultem as autoridades competentes antes de iniciarem os estudos de validação com base nas normas de desempenho e orientações constantes do presente método.

4. Estas normas baseiam-se nas normas de desempenho harmonizadas dos E.U.A. (ICCVAM), da UE (ECVAM) e do Japão (JaCVAM) (12) para avaliação da validade de versões similares ou modificadas do método LLNA. As normas de desempenho são constituídas pelos componentes essenciais do método de ensaio, pelos produtos químicos de referência recomendados e por normas de exatidão e de fiabilidade que o método proposto deve cumprir ou suplantar.

I. **Componentes essenciais do método de ensaio**

5. Para garantir que um método LLNA similar ou modificado é funcional e mecanisticamente análogo ao método LLNA e mede o mesmo efeito biológico, devem constar do protocolo do método de ensaio os seguintes componentes:

— Aplicação tópica da substância em estudo em ambas as orelhas dos ratos;

— Medição da proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo;

— Medição da proliferação de linfócitos durante a fase indutora da sensibilização cutânea;

— Escolha, como dosagem mais elevada da substância em estudo, da concentração máxima desta que não induz toxicidade sistémica nem irritação cutânea local excessiva nos ratos. Escolha, como dosagem mais elevada de um produto químico de referência de controlo positivo, de uma dose deste pelo menos tão elevada quanto a da estimativa da concentração necessária para gerar um índice de estimulação 3 (ver o quadro 1) sem causar toxicidade sistémica nem irritação cutânea local excessiva nos ratos;

— Inclusão em cada estudo, em paralelo, de um controlo do excipiente e, quando se justifique, também de um controlo positivo em paralelo;

— Utilização de pelo menos quatro animais por grupo de dosagem;

— Recolha de dados por animal ou agregados.

Se algum destes critérios não for preenchido, não é possível validar o método similar ou modificado com base nestas normas de desempenho.

II. **Lista mínima de produtos químicos de referência**

6. As normas de desempenho harmonizadas dos E.U.A. (ICCVAM), da UE (ECVAM) e do Japão (JaCVAM) (12) estabelecem uma lista mínima de 18 produtos químicos de referência a utilizar e quatro produtos químicos de referência facultativos (substâncias que geram resultados positivos falsos ou negativos falsos no método LLNA, comparativamente aos resultados obtidos em cobaias ou em pessoas – método B.6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE – (13), podendo assim ser utilizados para demonstrar desempenhos iguais ao do método LLNA ou melhores) que são incluídos nas normas de desempenho do método LLNA. Os critérios de seleção desses produtos químicos foram os seguintes:

— A lista de produtos químicos de referência representa os tipos de substâncias normalmente utilizados para determinar potenciais de sensibilização cutânea e a gama de respostas que o método LLNA é capaz de medir ou de prever;

— A estrutura química das substâncias está bem definida;

— Dispõe-se para cada substância de dados de ensaios de gânglios linfáticos locais (método B.6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE) (13) e, quando possível, de dados de ensaios em pessoas; e

— As substâncias estão facilmente disponíveis nos circuitos comerciais.

Os produtos químicos de referência recomendados constam do quadro 1. Nos estudos que recorram aos produtos químicos de referência propostos devem utilizar-se os excipientes correspondentes indicados no mesmo quadro. Se uma substância constante do quadro não estiver disponível, podem utilizar-se outras que preencham os critérios de escolha referidos, fundamentando devidamente esta opção.

Quadro 1

Produtos químicos de referência recomendados para efeitos das normas de desempenho de métodos LLNA

Número	Produto químico (1)	N.º CAS	Estado	Excipiente (2)	EC3 (%) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Intervalo efetivo da EC3	Método LLNA versus ensaio em cobaias	Método LLNA versus sensibilização humana
1	Mistura de 5-cloro2-metil4-isotiazolin3-ona (CMI) e 2-metil4-isotiazolin3-ona (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	Líquido	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sólido	AAZ	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	AAZ	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloreto de cobalto	7646-79-9	Sólido	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Líquido	AAZ	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzotiazole	149-30-4	Sólido	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Líquido	AAZ	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Líquido	AAZ	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Líquido	AAZ	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoato de fenilo	93-99-2	Sólido	AAZ	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Álcool cinamílico	104-54-1	Sólido	AAZ	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinilureia	39236-46-9	Sólido	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilato de metilo	80-62-6	Líquido	AAZ	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzeno	108-90-7	Líquido	AAZ	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Líquido	AAZ	50	1	NA	NA	–/–	–/+
16	Ácido láctico	50-21-5	Líquido	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato de metilo	119-36-8	Líquido	AAZ	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	AAZ	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Número	Produto químico (1)	N.º CAS	Estado	Excipiente (2)	EC3 (%) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Intervalo efetivo da EC3	Método LLNA versus ensaio em cobaias	Método LLNA versus sensibilização humana
Substâncias facultativas para demonstração de melhor desempenho relativamente ao LLNA										
19	Laurilsulfato de sódio	151-21-3	Sólido	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquido	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xileno	1330-20-7	Líquido	AAZ	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloreto de níquel	7718-54-9	Sólido	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abreviaturas: AAZ = mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1; N.º CAS = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*; DMF = *N*,*N*-dimetilformamida; DMSO = sulfóxido dimetílico; DNCB = 2,4-dinitroclorobenzeno; EC3 = estimativa da concentração necessária para gerar um índice de estimulação 3; Ensaio em cobaias = resultado do ensaio em cobaias (método B6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE) (13); HCA = aldeído hexilcinâmico; LLNA = resultado do ensaio de gânglios linfáticos locais em ratos (método B.42 ou *Test Guideline* 429 da OCDE) (2); MEK = metiletilcetona; NA = não aplicável, visto o índice de estimulação ser inferior a 3; NC = não calculado, visto os dados provirem de um único estudo; Excipiente = excipiente utilizado no ensaio.

(*) Considerado não sensibilizante do ser humano, por não terem sido localizados resultados de ensaios clínicos de emplastros, por não figurar nas séries de alergénios para ensaios com emplastros e por não terem sido localizados casos registados de sensibilização de pessoas.
(**) Não estão disponíveis dados na cobaia.
(1) Os produtos químicos devem ser preparados diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.
(2) Dados os efeitos potenciais dos diversos excipientes no desempenho do método LLNA, deve utilizar-se o excipiente recomendado para cada produto químico de referência (24) (32).
(3) Valor médio quando se dispõe de mais do que um valor de EC3. No caso das substâncias com resultado negativo (índice de estimulação < 3), indica-se a maior concentração ensaiada.
(4) Número de estudos pelo método LLNA de que provêm os dados.
(5) Disponível comercialmente sob a designação "Kathon CG" (n.º CAS 55965-84-9), que é uma mistura 3:1 de CMI e de MI. A concentração de cada componente varia de 1,1 % a 1,25 % (CMI) e de 0,3 % a 0,45 % (MI). Os componentes inativos são sais de magnésio (21,5 % a 24 %) e nitrato de cobre (0,15 % a 0,17 %), sendo o restante constituído por água (74 % a 77 %). O Kathon CG é fornecido pela Sigma-Aldrich e pela Rohm and Haas (agora Dow Chemical Corporation).

III. **Normas de fiabilidade e de exatidão**

7. A exatidão de um método LLNA similar ou modificado, avaliada com base na lista mínima prevista de 18 produtos químicos de referência, deve corresponder à das normas de desempenho de métodos LLNA, ou suplantá-la. O novo método ou o método modificado deve permitir uma decisão de classificação ("sim" ou "não") correta. O novo método ou o método modificado pode, porém, não permitir classificar corretamente todos os produtos químicos de referência constantes da lista mínima. Se, por exemplo, a classificação atribuída a um dos sensibilizantes fracos for incorreta, poderá ponderar-se a demonstração de desempenho equivalente com base numa explicação da classificação incorreta e em dados suplementares adequados (por exemplo, resultados experimentais conducentes à classificação correta de outras substâncias, com propriedades físico-químicas e sensibilizantes similares às do produto químico de referência classificado incorretamente). Nessas circunstâncias, a validação de um método de ensaio LLNA similar ou modificado será apreciada caso a caso.

Reprodutibilidade intralaboratorial

8. Para determinar a reprodutibilidade intralaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado, deve utilizar-se uma substância sensibilizante bem caracterizada pelo método LLNA. As normas de desempenho do método LLNA baseiam-se, para esse efeito, na variabilidade dos resultados de ensaios repetidos com aldeído hexilcinâmico. Para avaliar a fiabilidade intralaboratorial, devem obter-se estimativas de concentrações-limite (ECl) para o aldeído hexilcinâmico, em quatro ocasiões diferentes, com pelo menos uma semana de intervalo entre os ensaios. Considera-se a reprodutibilidade intralaboratorial aceitável se o laboratório for capaz de obter, em cada ensaio de aldeído hexilcinâmico, valores de ECl compreendidos entre 5 % e 20 %, correspondentes ao intervalo definido pela multiplicação por 0,5 e 2,0 da EC3 média especificada para o aldeído hexilcinâmico (10 %) no método LLNA (ver o quadro 1).

Reprodutibilidade interlaboratorial

9. Para determinar a reprodutibilidade interlaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado, devem utilizar-se duas substâncias sensibilizantes bem caracterizadas pelo método LLNA. As normas de desempenho do método LLNA baseiam-se na variabilidade dos resultados de ensaios efetuados com aldeído hexilcinâmico e 2,4--dinitroclorobenzeno em laboratórios diferentes. Devem determinar-se valores de ECl a partir de um único estudo efetuado independentemente em, pelo menos, três laboratórios distintos. Para que fique demonstrada uma reprodutibilidade interlaboratorial aceitável, cada laboratório deve obter valores de ECl compreendidos entre 5 % e 20 %, para o aldeído hexilcinâmico, e entre 0,025 % e 0,1 %, para o 2,4-dinitroclorobenzeno, que correspondem ao intervalo definido, respetivamente, pela multiplicação por 0,5 e 2,0 das concentrações EC3 médias especificadas para o aldeído hexilcinâmico (10 %) e para o 2,4-dinitroclorobenzeno (0,05 %) no método LLNA (ver o quadro 1).

Apêndice 2

Definições

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo "concordância" são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (14).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Estimativa de concentração estabelecida como limite (ECl): Concentração de uma substância em estudo que se estima necessária para gerar um índice de estimulação indicativo de resposta positiva.

Estimativa de concentração "índice 3" (EC3): Concentração de uma substância em estudo que se estima necessária para gerar um índice de estimulação 3.

Falso negativo: Substância em estudo incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa.

Falso positivo: Substância em estudo incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa.

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também é designada por "reprodutibilidade entre laboratórios" (14).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por "reprodutibilidade no laboratório" (14).

Ensaio "me-too": Expressão coloquial em inglês que designa um método de ensaio estrutural e funcionalmente similar a um método de referência validado e aceite. Um método com estas características é candidato a validação por similitude. O termo é sinónimo de "método de ensaio similar" (14).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Integram essas normas: i) os componentes essenciais do método de ensaio, ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, selecionados entre os produtos químicos utilizados para demonstrar a aceitabilidade do desempenho do método de ensaio validado, e iii) os níveis de exatidão e de fiabilidade, comparáveis aos obtidos com o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve evidenciar ao ser avaliado utilizando a lista mínima de produtos químicos de referência (14).

Método de ensaio sujeito a direitos de propriedade: Método de ensaio cujas manufatura e distribuição são abrangidas por patentes, direitos de autor, marcas comerciais, etc.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Produtos químicos de referência: Produtos químicos selecionados para serem utilizados no processo de validação, cujas respostas aos sistemas de ensaio de referência *in vitro* ou *in vivo*, ou na espécie em causa, já são conhecidas. Estes produtos químicos devem ser representativos das classes de produtos químicos para as quais está prevista a utilização do método de ensaio e devem traduzir toda a gama de respostas (forte, fraca, negativa) que são de esperar dos produtos químicos aos quais o método se destina. Fases diferentes do processo de validação, métodos de ensaio diferentes e utilizações diferentes do mesmo ensaio podem exigir séries diferentes de produtos químicos de referência (14).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (14).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (14).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. É importante referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (14).»

2. O capítulo B.46 passa a ter a seguinte redação:

«**B.46. IRRITAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA**

INTRODUÇÃO

1. Entende-se por irritação cutânea a produção de danos reversíveis na pele por aplicação de um produto químico em estudo durante, no máximo, quatro horas – definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (1) (3). O presente método de ensaio descreve uma técnica *in vitro* que pode ser utilizada para identificar os perigos associados a produtos químicos (substâncias e misturas) irritantes da categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE (1) (2) (3). Na UE e noutras zonas geográficas que não adotaram a categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros), pode também utilizar-se este método para identificar produtos químicos não classificados (rubrica "nenhuma categoria" nos sistemas GHS da ONU e CRE da UE) (1) (3). O presente método pode ser utilizado para determinar o poder de irritação cutânea de produtos químicos e constitui um ensaio independente alternativo a estudos de irritação cutânea *in vivo*, no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial por etapas [(4) e capítulo B.4 deste anexo].

2. A determinação da irritação cutânea tem normalmente utilizado animais de laboratório (*Test Guideline* 404 da OCDE, capítulo B.4 do presente anexo) (4). No contexto da preocupação com o bem-estar animal, o método B.4 foi revisto em 2004 e permite determinar a corrosão/irritação cutânea por aplicação de uma estratégia de ensaio sequencial, por etapas, com base em métodos *in vitro* e *ex vivo* validados, assim se evitando o sofrimento de animais. A OCDE adotou, como *Test Guidelines*, três métodos de ensaio *in vitro* validados, com os números 430, 431 e 435 (5) (6) (7), constituindo dois deles os capítulos B.40 e B.40A do presente anexo. Destinam-se a ser utilizados para a componente "corrosividade" da estratégia de ensaio por etapas do método B.4 ou do *Test Guideline* 404 da OCDE (4).

3. O presente método dá indicações quanto à irritação cutânea no ser humano. Baseia-se em epiderme humana reconstruída, cuja conceção geral (utilização de queratinócitos de epiderme humana não transformados como fonte celular, tecido representativo e citoarquitectura) reproduz com muita fidelidade as propriedades bioquímicas e fisiológicas das camadas superiores da pele humana, isto é, da epiderme. O método inclui ainda uma série de normas de desempenho (apêndice 2) para avaliação de métodos similares ou modificados que utilizam epiderme humana reconstruída, desenvolvidos pela ECVAM da UE (8) de acordo com os princípios do documento de orientação (*Guidance Document*) n.º 34 da OCDE (9).

4. Estão validados três métodos conformes com o presente método de ensaio. Concluíram-se os estudos de pré-validação, otimização e validação de um método *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) baseado num modelo de epiderme humana reconstruída, comercializado com a designação EpiSkin™ (método de referência validado). Dois outros métodos *in vitro*, comercializados com as designações EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE (22), destinados a determinações de irritação cutânea e que utilizam epiderme humana reconstruída, deram resultados similares ao do método de referência validado, por aplicação das normas de desempenho estabelecidas para efeitos de validação (21).

5. Antes de se poder utilizar, numa perspetiva normativa, um ensaio *in vitro* proposto, similar ou modificado, baseado em epiderme humana reconstruída, diverso do método de referência validado, do método EpiDerm™ SIT (EPI-200) e do método SkinEthic™ RHE, importa determinar a fiabilidade, a adequação (exatidão) e as limitações do método em causa na utilização proposta, para garantir a similitude com o método de referência validado, em conformidade com as normas de desempenho estabelecidas no presente método (apêndice 2). Recomenda-se a consulta do *Explanatory Background Document on in vitro skin irritation testing* da OCDE (documento explicativo de base dos ensaios de irritação cutânea *in vitro*) antes do desenvolvimento e da validação de métodos *in vitro* similares ou modificados que utilizam epiderme humana reconstruída e de se solicitar a adoção dos mesmos com caráter normativo (23).

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Uma limitação do método de ensaio, demonstrada no estudo de validação (16), reside no facto de não permitir classificar produtos químicos na categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros) (1). Quando é utilizado como ensaio alternativo parcial, pode ser necessário complementá-lo com ensaios *in vivo*, a fim de caracterizar completamente o potencial de irritação cutânea [(4) e capítulo B.4 do presente anexo]. É sabido que a utilização de pele humana está sujeita a condições e considerações nacionais e internacionais de natureza ética.

8. Este método de ensaio incide na componente *in vitro* da irritação cutânea da estratégia de ensaio sequencial por etapas no domínio da irritação/corrosão dérmica do método B.4 (*Test Guideline* 404 da OCDE) (4). Embora o presente método não forneça informações adequadas sobre corrosão cutânea, importa referir que o método B.40A (*Test Guideline* 431 da OCDE) relativo à corrosão da pele se baseia no mesmo sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída, embora utilize outro protocolo (capítulo B.40A). O presente método baseia-se em modelos de epiderme humana reconstruída com queratinócitos humanos, a qual representa, portanto, *in vitro*, o órgão-alvo da espécie em causa. O método cobre ainda, diretamente, a fase inicial do mecanismo de ação/processo inflamatório (lesões celulares e dos tecidos que originam traumatismos localizados) que ocorre na irritação *in vivo*. Durante a validação do método, ensaiou-se uma vasta gama de produtos químicos, contando a base de dados empírica do estudo de validação com 58 produtos químicos (16) (18) (23). O método é aplicável a sólidos, líquidos, semissólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem ser finamente moídos antes da aplicação. Não é necessário nenhum outro pré-tratamento das amostras. O estudo de validação ainda não incidiu em gases e aerossóis (24). Embora se admita que uns e outros possam ser ensaiados recorrendo à tecnologia da epiderme humana reconstruída, a versão atual do método não está vocacionada para ensaios de gases nem de aerossóis. É também de referir que os produtos químicos fortemente corados podem interferir com as medições de viabilidade celular, sendo necessário utilizar controlos corretivos adequados (ver os pontos 24 a 26).

9. Quando a classificação do produto químico em estudo é inequívoca, é normalmente suficiente uma série de ensaios constituída por um triplicado dos tecidos. Porém, nos casos inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou percentagem de viabilidade média igual a 50 % ± 5 %), é de ponderar a realização de uma segunda série de ensaios, bem como de uma terceira se os resultados das duas primeiras séries forem discordantes.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

10. O produto químico em estudo é aplicado localmente num modelo tridimensional de epiderme humana reconstruída, constituído por queratinócitos de epiderme humana não transformados, cultivados de modo a formarem um modelo de epiderme humana com várias camadas e altamente diferenciado. O modelo é constituído por uma camada basal, uma camada espinhosa e uma camada granulosa organizadas e por um *stratum corneum* em várias camadas, com uma estrutura lipídica lamelar intercelular representativa das principais classes de lípidos, semelhante ao observado *in vivo*.

11. A irritação cutânea induzida por produtos químicos, manifestada por eritema e edema, resulta de uma série de acontecimentos iniciada com a penetração do *stratum corneum* e lesão das camadas subjacentes de queratinócitos. Ao começarem a morrer, os queratinócitos libertam mediadores que desencadeiam o processo inflamatório, o qual afeta as células da derme, em especial as células estromáticas e endoteliais. A dilatação e permeabilidade crescente das células endoteliais origina o eritema e o edema observados (24). Os métodos que utilizam epiderme humana reconstruída medem os acontecimentos iniciais deste processo.

12. A viabilidade celular nos modelos de epiderme humana reconstruída é medida pela conversão enzimática do corante vital MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1 – num sal azul de formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (25). Os produtos químicos irritantes são identificadas com base na sua capacidade de redução da viabilidade celular para valores inferiores a limites definidos (≤ 50 % no caso das substâncias irritantes classificadas na categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE). Consoante o quadro regulamentar no qual os resultados obtidos por este método sejam utilizados, os produtos químicos a que estejam associadas viabilidades celulares acima do limite definido podem ser considerados não-irritantes (> 50 %, nenhuma categoria).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

13. Antes de passarem a utilizar, por rotina, algum dos três métodos validados em conformidade com o presente método de ensaio, cada laboratório terá de demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito os 10 produtos químicos de referência indicados no quadro 1. No caso de métodos similares ao presente método ou de modificações de algum dos três métodos validados, é necessário cumprir as normas de desempenho especificadas no apêndice 2 antes de utilizar o método em causa em ensaios normativos.

14. No âmbito da confirmação de competência, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos especificadas pelo fabricante do modelo de epiderme humana reconstruída. Este aspeto é especialmente importante se os tecidos forem expedidos a longas distâncias ou demorarem muito tempo a chegar. A partir do momento em que o método esteja implantado e tenha sido demonstrada competência para utilizá-lo, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar um método por rotina, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

Quadro 1

Produtos químicos de referência [1]

Produto químico	N.º CAS	Pontuação *in vivo* [2]	Estado	Categoria GHS da ONU/CRE da UE
Ácido naftalenoacético	86-87-3	0	Sólido	Nenhuma
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Nenhuma
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Nenhuma
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Nenhuma (*categoria 3 facultativa*) [3], [4]
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Nenhuma (*categoria 3 facultativa*) [3], [4]
Ciclamenaldeído	103-95-7	2,3	Líquido	Categoria 2
1-Bromo-hexano	111-25-1	2,7	Líquido	Categoria 2
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Categoria 2
1-Metil3-fenil1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Categoria 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Líquido	Categoria 2

[1] Os produtos químicos de referência constantes desta lista fazem parte da série utilizada no estudo de validação.
[2] Pontuação *in vivo* de acordo com o método B.4 e com o *Test Guideline* 404 da OCDE (4).
[3] No âmbito do presente método, a categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros) (1) é referida como "nenhuma categoria".
[4] A categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU não é aplicável no âmbito do sistema CRE da UE.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

15. Descrevem-se a seguir os componentes e procedimentos de um método baseado em epiderme humana reconstruída para avaliação da irritação cutânea. O modelo de epiderme humana reconstruída pode ser preparado no laboratório ou obtido no comércio. Estão disponíveis procedimentos operacionais normalizados para o EpiSkin™, o EpiDerm™ SIT (EPI-200) e o SkinEthic™ RHE (26)(27)(28). Na realização dos ensaios deve ter-se em conta o seguinte:

Componentes do método de ensaio de epiderme humana reconstruída

Condições gerais

16. Na reconstrução do epitélio, utilizam-se queratinócitos humanos não transformados. Devem estar presentes várias camadas de células epiteliais viáveis (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa), sob um *stratum corneum* funcional. Este deve ter várias camadas e possuir um perfil lipídico que permita estabelecer uma barreira funcional suficientemente robusta para resistir a uma penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos, por exemplo, dodecilsulfato de sódio (SDS) ou Triton X-100. A função de barreira deve ser demonstrada e pode ser avaliada determinando a concentração à qual o produto químico marcador reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (CI_{50}), após um tempo de exposição fixo, ou determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (TE_{50}), após ser aplicada uma dada concentração fixa do produto químico marcador. As propriedades de contenção do modelo de epiderme humana reconstruída devem impedir a passagem de matéria para o tecido viável por contorno do *stratum corneum*, que redundaria numa modelação deficiente da exposição cutânea. O modelo de epiderme humana reconstruída não deve estar contaminado por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Condições funcionais

Viabilidade

17. Para quantificar a viabilidade recorre-se ao método do MTT (25). Os utilizadores do modelo de epiderme humana reconstruída devem garantir que cada lote do modelo utilizado preenche os critérios definidos para o controlo negativo. A densidade ótica do solvente de extração isolado deve ser suficientemente baixa (< 0,1). As entidades que desenvolvem/fornecem o modelo de epiderme humana reconstruída estabeleceram intervalos de aceitabilidade (limites superior e inferior) para os valores de densidade ótica dos controlos negativos (nas condições do método de ensaio de irritação cutânea), que se indicam no quadro 2 para os três métodos validados. Os tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo devem, comprovadamente, manter-se estáveis em cultura durante todo o período de exposição do ensaio (medições de viabilidade semelhantes).

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade para os valores de densidade ótica dos controlos negativos

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Função de barreira

18. O *stratum corneum* e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir a uma penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos (por exemplo, SDS ou Triton X-100), estimada com base na CI_{50} ou no TE_{50} (quadro 3).

Morfologia

19. O exame histológico do modelo de epiderme humana reconstruída deve revelar uma estrutura de epiderme humana (incluindo um *stratum corneum* com várias camadas).

Reprodutibilidade

20. Os resultados obtidos por aplicação do método ao produto químico de controlo positivo e aos controlos negativos devem mostrar-se continuadamente reprodutíveis.

Controlo de qualidade

21. As entidades que desenvolvem/fornecem o modelo de epiderme humana reconstruída devem assegurar e demonstrar que todos os lotes do modelo preenchem os critérios de liberação da produção estabelecidos, dos quais os mais importantes são os de *viabilidade* (ponto 17), *função de barreira* (ponto 18) e *morfologia* (ponto 19). Estes dados devem ser facultados aos utilizadores do método, para que estes possam fazer constar tais informações dos seus relatórios. A entidade que desenvolve/fornece o modelo de epiderme humana reconstruída (ou o investigador, quando utilize modelo próprio) deve definir um intervalo de aceitabilidade (limites inferior e superior) para a CI_{50} ou o TE_{50}. Apenas podem ser utilizados com fiabilidade na previsão de classificações de irritação resultados obtidos com tecidos que possuam as características exigidas. A título de exemplo, apresentam-se no quadro 3 os intervalos de aceitabilidade dos três métodos validados.

Quadro 3

Exemplos de critérios de controlo de qualidade para a liberação de lotes

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamento com SDS)(26)	CI_{50} = 1,0 mg/ml	CI_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (Triton X-100 a 1 %)(27)	TE_{50} = 4,8 h	TE_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (Triton X-100 a 1 %)(28)	TE_{50} = 4,0 h	TE_{50} = 9,0 h

Aplicação das substâncias em estudo e de controlo

22. Devem utilizar-se em cada série pelo menos três replicados de cada produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo. Tanto no caso das substâncias líquidas como das substâncias sólidas, deve aplicar-se uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, ou seja, no mínimo 25 µl/cm^2 ou 25 mg/cm^2. No caso dos sólidos, a superfície da epiderme deve ser humidificada, com água desionizada ou destilada, antes da aplicação, para melhorar o contacto entre o produto químico em estudo e a superfície epidérmica. Sempre que possível, os sólidos devem ser ensaiados na forma de pó fino. Após o período de exposição, o produto químico em estudo deve ser cuidadosamente removido da superfície da epiderme, por lavagem com uma solução-tampão aquosa ou uma solução a 0,9 % de NaCl. Consoante o método de epiderme humana reconstruída que for utilizado, dos três validados, o período de exposição pode variar entre 15 minutos e 60 minutos e a temperatura de incubação entre 20 °C e 37 °C. Estes períodos de exposição e temperaturas estão otimizados para cada método de epiderme humana reconstruída e refletem as diferentes propriedades intrínsecas dos métodos – ver os procedimentos operacionais normalizados dos métodos em (26) (27) (28).

23. Devem utilizar-se em cada série de ensaios produtos químicos de controlo negativos e positivos, para demonstrar que a viabilidade (com o controlo negativo), a função de barreira e a sensibilidade resultante (com o controlo positivo) dos tecidos se situam no intervalo histórico de aceitabilidade definido. Sugere-se a utilização de solução aquosa a 5 % de SDS como produto químico de controlo positivo. Como produto químico de controlo negativo, sugere-se a utilização de água ou de solução-tampão de fosfato (PBS).

Medição da viabilidade celular

24. O elemento mais importante do procedimento de ensaio é que as medições de viabilidade não sejam efetuadas imediatamente após a exposição aos produtos químicos em estudo, mas sim após um período suficientemente longo de incubação dos tecidos lavados em meio fresco, depois do tratamento. Esse período permite, tanto a recuperação de efeitos citotóxicos fracos, como a manifestação de efeitos citotóxicos claros. Na fase de otimização do ensaio (11) (12) (13) (14) (15), verificou-se que a duração ótima do período de incubação depois do tratamento é de 42 horas.

25. Para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método, deve utilizar-se o método quantitativo validado do MTT, que é compatível com a arquitetura tridimensional dos tecidos. Coloca-se a amostra destes numa solução de MTT de concentração apropriada (por exemplo, 0,3-1 mg/ml), durante três horas. O precipitado azul de formazano é depois extraído dos tecidos com um solvente (por exemplo, isopropanol ou isopropanol acidificado), determinando-se a concentração de formazano por medição da densidade ótica ao comprimento de onda de 570 nm, utilizando um filtro de banda passante de ± 30 nm, no máximo.

26. As propriedades óticas do produto químico em estudo, ou a reação química deste com o MTT, podem interferir no ensaio, gerando estimativas erróneas de viabilidade (caso o produto químico em estudo evite ou reverta a coloração ou produza coloração). Isto pode suceder se o produto químico em estudo não for completamente removido dos tecidos por lavagem ou se penetrar na epiderme. Se o produto químico em estudo agir diretamente no MTT (redutor do MTT), for naturalmente corado ou adquirir coloração durante o tratamento dos tecidos, devem ser utilizados produtos químicos de controlo suplementares, que permitam detetar interferências do produto químico em estudo na técnica de medição da viabilidade e corrigir esse efeito. Os procedimentos operacionais normalizados descrevem pormenorizadamente, para os três métodos validados, o modo como podem corrigir-se a redução direta do MTT e as interferências de agentes corantes (26) (27) (28).

Critérios de aceitabilidade

27. Em cada método que utilize lotes válidos do modelo de epiderme humana reconstruída (ver o ponto 21), a densidade ótica dos tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo deve refletir a qualidade de tecidos sujeitos a expedição, às etapas de receção e a todos os processos do protocolo. A densidade ótica dos produtos químicos de controlo não deve ser inferior aos limites históricos estabelecidos. Analogamente, os tecidos tratados com o produto químico de controlo positivo – ou seja, com solução aquosa a 5 % de SDS – devem manifestar a capacidade de reação dos tecidos ao produto químico irritante nas condições do método de ensaio (26) (27) (28). Devem definir-se estimativas conexas adequadas da variabilidade dos resultados dos replicados de tecidos (por exemplo, se se recorrer a desvios-padrão, devem estar dentro do intervalo de tolerância de 95 % calculado em teste assimétrico a partir dos dados históricos; para o método de referência validado, o desvio-padrão é inferior a 18 %).

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

28. Os valores de densidade ótica obtidos para cada produto químico em estudo podem ser utilizados para calcular a percentagem de viabilidade normalizada em relação à correspondente ao controlo negativo, que é fixada em 100 %. Importa definir claramente e documentar a percentagem de viabilidade celular que estabelece a diferenciação entre os produtos químicos em estudo irritantes e não classificados e o(s) método(s) estatístico(s) utilizado(s) para avaliar os resultados e identificar os produtos químicos irritantes, devendo ainda demonstrar-se que são adequados. Indicam-se a seguir os valores limite de diferenciação para a previsão de efeitos irritantes:

    — Considera-se o produto químico em estudo irritante da pele, da categoria 2 dos sistema GHS da ONU/CRE da UE, se a viabilidade dos tecidos depois da exposição e da incubação subsequente ao tratamento for inferior ou igual a 50 %.

    — Consoante o quadro regulamentar no qual os resultados deste método de ensaio forem utilizados, o produto químico em estudo pode ser considerado não irritante da pele, correspondendo-lhe a classificação de "nenhuma categoria" nos termos dos sistema GHS da ONU/CRE da UE, se a viabilidade dos tecidos depois da exposição e da incubação subsequente ao tratamento for superior a (>) 50 %.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

29. Para cada série de ensaios, devem ser apresentados num quadro os dados respeitantes a cada replicado de tecidos (por exemplo, valores de densidade ótica e percentagens de viabilidade celular calculadas para cada produto químico em estudo, bem como a classificação correspondente), incluindo os dados relativos às repetições de ensaios eventualmente efetuadas. Deve igualmente ser indicada para cada série de ensaios a média ± desvio-padrão. Devem referir-se ainda, para cada produto químico estudado, as interações observadas com o MTT e se é corado.

Relatório do ensaio

30. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

    Produtos químicos em estudo e de controlo:

    — Denominação ou denominações químicas – denominação e número CAS, denominação e número CE, etc. –, se forem conhecidas;

    — Grau de pureza e composição do produto químico (em percentagem ponderal);

    — Propriedades físico-químicas (por exemplo, estado, estabilidade, volatilidade, pH e hidrossolubilidade, se forem conhecidos) pertinentes para o estudo;

    — Pré-tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

    — Condições de armazenagem.

    Justificação do modelo de epiderme humana reconstruída e do protocolo utilizados.

    Condições de ensaio:

    — Sistema celular utilizado;

    — Informações completas que substanciem o modelo específico de epiderme humana reconstruída utilizado, incluindo dados sobre o desempenho do mesmo, por exemplo:

        i) viabilidade,

        ii) função de barreira,

        iii) morfologia,

        iv) reprodutibilidade e previsibilidade,

        v) controlo de qualidade do modelo;

    — Elementos sobre o procedimento de ensaio seguido;

    — Dosagens de ensaio utilizadas e duração da exposição e do período de incubação depois do tratamento;

    — Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio;

— Referência a dados históricos sobre o modelo, por exemplo:

i) aceitabilidade dos dados de controlo de qualidade relativamente a dados históricos de lotes,

ii) aceitabilidade dos valores obtidos para os produtos químicos de controlo positivo e negativo relativamente a médias e intervalos correspondentes a tais produtos;

— Descrição dos critérios de avaliação utilizados, incluindo a justificação do(s) ponto(s) de diferenciação selecionado(s) para o modelo preditivo;

— Referência a dados históricos de controlo.

Resultados:

— Quadro dos dados correspondentes a cada produto químico estudado, por série de ensaios e medição de replicados;

— Indicação dos controlos utilizados no caso dos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos estudados que apresentem coloração;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

REFERÊNCIAS

(1) UN (2009). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Third revised edition. ONU, Nova Iorque e Genebra. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi//ghs/ghs_rev03/03files_e.html].

(2) CE-ECVAM (2009). Statement on the "Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards". Publicado pelo ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 de abril de 2009. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(3) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006, JO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

(4) OCDE (2004). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(5) OCDE (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(6) OCDE (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OCDE (2006). *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) CE-ECVAM (2009). Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE). Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M., Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro*, 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C., Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicol. in Vitro*, 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B., Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX*, 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test. *ATLA*, 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R., Rubinsteen, G. (2005). The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *ATLA*, 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C., Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. *ATLA*, 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. *ATLA*, 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. *ATLA*, 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E., Leclaire, J. (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients. *AATEX*, 14, 351-358.

(20) CE-ECVAM (2007). Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 de abril de 2007. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(21) CE-ECVAM (2007). Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(22) CE-ECVAM (2008). Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 de novembro de 2008. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(23) OCDE (2010). Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org//document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html].

(24) Welss, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R. (2004). *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. in Vitro*, 18, 231-243.

(25) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (fevereiro de 2009). ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (revisto em março de 2009). Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), for use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (fevereiro de 2009). SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., Maibach, H.I. (1995). Irritant contact dermatitis, *in* Practical Contact Dermatitis, p. 7-18 (Ed. Guin. J. D.). Mc Graw-Hill, Nova Iorque.

(30) Diretiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de agosto de 2001, que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Diretiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (JO L 225 de 21.8.2001, p. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P., Robinson, M.K. (2004). Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis*, 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M., Kandarova, H. (2007). Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data. *ALTEX*, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M., Kandárová, H. (2010). Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

Apêndice 1

Definições

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo "concordância" são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (9).

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular (por exemplo, em termos de capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares para reduzirem o corante vital MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo); consoante o indicador determinado e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total de células vivas e/ou a vitalidade dessas células.

Concordância: Mede o desempenho do método de ensaio no caso dos métodos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo "exatidão" são utilizados indistintamente; é definido como a proporção dos produtos químicos ensaiados que são classificados corretamente positivos ou negativos (9).

TE_{50}: Pode ser estimado determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 %, após aplicação de uma dada concentração fixa de um marcador químico; ver também CI_{50}.

Sistema CRE da UE (Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas: Aplica na União Europeia o sistema GHS da ONU de classificação e rotulagem de produtos químicos (substâncias e misturas) (3).

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas – ONU): Sistema (designado em inglês por "*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*") que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

CI_{50}: Pode ser estimada determinando a concentração à qual um produto químico marcador reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (CI_{50}), após um tempo de exposição fixo; ver também TE_{50}.

Dose infinita: Quantidade do produto químico em estudo aplicado à epiderme que excede a quantidade necessária para recobrir completa e uniformemente a superfície epidérmica.

Ensaio "me-too": Expressão coloquial em inglês que designa um método de ensaio estrutural e funcionalmente similar a um método de referência validado e aceite. Um método com tais características é candidato a validação por similitude. O termo é sinónimo de "método de ensaio similar" (9).

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Integram essas normas: i) os componentes essenciais do método de ensaio, ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, selecionados entre os produtos químicos utilizados para demonstrar a aceitabilidade do desempenho do método de ensaio validado e iii) os níveis de exatidão e de fiabilidade, comparáveis aos obtidos com o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve evidenciar ao ser avaliado utilizando a lista mínima de produtos químicos de referência (9).

Produto químico de referência: Produto químico selecionado para ser utilizado no processo de validação, cujas respostas aos sistemas de ensaio de referência *in vitro* ou *in vivo*, ou na espécie em causa, já são conhecidas. Estes produtos químicos devem ser representativos das classes de produtos químicos para as quais está prevista a utilização do método de ensaio e devem traduzir toda a gama de respostas (forte, fraca, negativa) que são de esperar dos produtos químicos aos quais o método se destina. Fases diferentes do processo de validação, métodos de ensaio diferentes e utilizações diferentes do mesmo ensaio podem exigir séries diferentes de produtos químicos de referência (9).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (9).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (9).

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para identificação de perigos e/ou avaliação de riscos, que se concluiu proporcionar proteção equivalente, ou melhorar a proteção, da saúde pública e animal ou do ambiente, consoante o caso, comparativamente ao ensaio de rotina aceite, no que respeita a todos os produtos químicos e situações de ensaio possíveis (9).

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos em estudo positivos/ativos que são corretamente classificadas pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (9).

Irritação cutânea: Produção de danos reversíveis na pele por aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. A irritação cutânea é uma reação local, não imunogénica, que surge pouco depois do estímulo (29). A sua característica principal é a reversibilidade do processo, no qual se produzem reações inflamatórias e surge a maior parte dos sinais clínicos característicos das irritações associadas a processos inflamatórios (eritema, edema, prurido e dor).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos em estudo negativos/inativos que são corretamente classificadas pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (9).

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Utilização sequencial de vários métodos de ensaio num ensaio. A escolha do método de ensaio a utilizar em cada etapa da sequência é decidida com base nos resultados obtidos na etapa de ensaio anterior (9).

Produto químico em estudo (ou substância química em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Apêndice 2

Normas de desempenho para avaliação de métodos similares ou modificados propostos para ensaios *in vitro* de irritação cutânea em epiderme humana reconstruída

INTRODUÇÃO

1. O objetivo das normas de desempenho consiste em comunicar os termos com base nos quais é possível determinar se um método novo, sujeito ou não a direitos de propriedade (direitos de autor, marca comercial ou registo), é suficientemente exato e fiável para certas finalidades de ensaio. Estas normas baseiam-se em métodos de ensaio validados e aceites e podem ser utilizadas para avaliar a fiabilidade e exatidão de métodos análogos (designados coloquialmente em inglês por "métodos '*me-too*' "), baseados em princípios científicos semelhantes e que medem ou preveem o mesmo efeito biológico ou tóxico (9).

2. Antes da adoção de métodos modificados (ou seja, aperfeiçoamentos a métodos aprovados), deve avaliar-se o efeito das alterações propostas no desempenho do ensaio e em que medida essas alterações afetam as informações disponíveis para os outros componentes do processo de validação. Em função do número e da natureza das alterações propostas, dos dados de que se disponha e da documentação de apoio às alterações em causa, estas devem ser sujeitas a um processo de validação idêntico ao descrito para um novo ensaio ou, se for caso disso, a uma avaliação limitada de fiabilidade e adequação com base em normas de desempenho estabelecidas (9).

3. Os métodos similares ("*me-too*") a algum dos três métodos validados – EpiSkin™ (método de referência validado), EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE] –, ou as modificações destes, cuja utilização no âmbito do presente método de ensaio seja proposta, devem ser avaliados com vista à determinação da sua fiabilidade e exatidão, utilizando produtos químicos representativos de toda a gama da escala de irritação de Draize. Na sua avaliação por recurso aos 20 produtos químicos de referência recomendados nas normas de desempenho (quadro 1), os métodos de ensaio similares ou modificados propostos devem exibir valores de fiabilidade e exatidão comparáveis aos do método de referência validado, ou melhores do que os deste (quadro 2) (2) (16). Os valores de fiabilidade e de exatidão pretendidos figuram nos pontos 8 a 12 do presente apêndice. Fazem parte da lista produtos químicos não classificados (rubrica "nenhuma categoria" no sistema GHS da ONU/CRE da UE) e classificados (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE), representativos de diversas classes químicas, para que a fiabilidade e a exatidão (sensibilidade, especificidade e exatidão global) do método proposto possam ser comparadas com as do método de referência validado. Antes de se utilizar o método para o ensaio de novos produtos químicos, há que determinar a sua fiabilidade e a sua capacidade para identificar corretamente produtos químicos irritantes da categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e – consoante o quadro regulamentar a que se destinem os dados – também a sua capacidade para identificar corretamente produtos químicos a que corresponda a classificação "nenhuma categoria" do sistema GHS da ONU/CRE da UE.

4. Estas normas baseiam-se nas normas de desempenho da UE (ECVAM) (8), atualizadas em função dos sistemas de classificação e rotulagem GHS da ONU e CRE da UE (1) (3). As normas de desempenho originais foram definidas após o estudo de validação (21) e baseiam-se no sistema de classificação da UE estabelecido na Diretiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de agosto de 2001, que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Diretiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas ([1]). Uma vez que, entre a conclusão do estudo de validação e o termo da elaboração do presente método, se adotou o sistema GHS da ONU para a classificação e a rotulagem na UE (sistema CRE da UE) (3), atualizaram-se as normas de desempenho (8). A atualização incide, sobretudo, i) na lista de produtos químicos de referência prevista nas normas de desempenho e ii) nos valores definidos de fiabilidade e exatidão (2) (23).

NORMAS DE DESEMPENHO PARA MÉTODOS DE ENSAIO *IN VITRO* DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

5. As normas de desempenho compreendem os seguintes três elementos principais:

I) Componentes essenciais do método de ensaio

II) Lista mínima de produtos químicos de referência

III) Valores definidos de fiabilidade e de exatidão

I) **Componentes essenciais do método de ensaio**

6. Trata-se dos elementos essenciais, de natureza estrutural, funcional e processual, dos métodos validados, que têm de constar do protocolo dos métodos propostos, mecanística e funcionalmente similares ou modificados. Estes componentes incluem as especificidades do método, elementos críticos do procedimento de ensaio e medidas de controlo de qualidade. A incorporação dos componentes essenciais do método de ensaio contribui para garantir que um método similar ou modificado proposto se baseia em conceitos idênticos aos do método de referência validado (9). Nos pontos 16 a 21 deste método, descrevem-se em pormenor os componentes essenciais do método de ensaio. Na realização dos ensaios deve ter-se em conta o seguinte:

— Condições gerais (ponto 16).

— Condições funcionais, que incluem:

  — viabilidade (ponto 17),

  — função de barreira (ponto 18),

  — morfologia (ponto 19),

  — reprodutibilidade (ponto 20),

  — controlo de qualidade (ponto 21).

II) **Lista mínima de produtos químicos de referência**

7. Utilizam-se produtos químicos de referência para determinar se a fiabilidade e a exatidão de um método de ensaio similar ou modificado proposto, que comprovadamente tenha uma semelhança suficiente, em termos estruturais e funcionais, ao método de referência validado, ou que constitua uma modificação menor de um dos três métodos validados, são comparáveis ou melhores do que as do método de referência validado (2) (8) (16) (23). Os 20 produtos químicos de referência recomendados que constam do quadro 1 são representativos de várias classes químicas (categorias químicas definidas com base em grupos funcionais) e de toda a gama da escala de irritação de Draize (de não irritante a fortemente irritante). Os produtos químicos constantes da lista compreendem 10 da categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e 10 "não classificados", dos quais três pertencentes à categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU. No âmbito do presente método, a categoria 3 facultativa é referida como "nenhuma categoria". Os produtos químicos que constam do quadro 1 foram selecionados entre os utilizados na fase de otimização que se seguiu à pré-validação, bem como no estudo de validação do método de referência, no que respeita aos grupos funcionais e ao estado físico (14) (18). Para avaliar a exatidão e a fiabilidade de métodos similares ou modificados propostos, devem utilizar-se, no mínimo, os produtos químicos de referência; todavia, estes não devem ser utilizados no desenvolvimento de novos métodos. Se um produto químico constante da lista não estiver disponível, podem utilizar-se outros produtos químicos para os quais se disponha de dados *in vivo* de referência adequados, preferencialmente dos produtos químicos utilizados na fase de otimização que se seguiu à pré-validação ou no estudo de validação do método de referência. Para avaliar melhor a exatidão de um método proposto, podem acrescentar-se à lista mínima de produtos químicos de referência outros produtos químicos, que sejam representativos de outras classes químicas e para os quais se disponha de dados de referência *in vivo* adequados.

([1]) JO L 225 de 21.8.2001, p. 1.

Quadro 1

Lista mínima de produtos químicos de referência para quantificação da exatidão e fiabilidade de métodos similares ou modificados de irritação cutânea em epiderme humana reconstruída [1].

Produto químico	Número CAS	Estado	Pontuação *in vivo*	Categoria no método de referência validado in vitro	Categoria GHS da ONU/CRE da UE, *in vivo*
1-Bromo4-clorobutano	6940-78-9	Líquido	0	Categoria 2	Nenhuma
Ftalato de dietilo	84-66-2	Líquido	0	Nenhuma	Nenhuma
Ácido naftalenoacético	86-87-3	Sólido	0	Nenhuma	Nenhuma
Fenoxiacetato de alilo	7493-74-5	Líquido	0,3	Nenhuma	Nenhuma
Isopropanol	67-63-0	Líquido	0,3	Nenhuma	Nenhuma
4-(Metiltio)benzaldeído	3446-89-7	Líquido	1	Categoria 2	Nenhuma
Estearato de metilo	112-61-8	Sólido	1	Nenhuma	Nenhuma
Butirato de heptilo	5870-93-9	Líquido	1,7	Nenhuma	Nenhuma
Salicilato de hexilo	6259-76-3	Líquido	2	Nenhuma	Nenhuma
Cinamaldeído	104-55-2	Líquido	2	Categoria 2	Nenhuma (*categoria 3 facultativa*) [3]
1-Decanol [2]	*112-30-1*	*Líquido*	*2,3*	*Categoria 2*	*Categoria 2*
Ciclamenaldeído	103-95-7	Líquido	2,3	Categoria 2	Categoria 2
1-Bromo-hexano	111-25-1	Líquido	2,7	Categoria 2	Categoria 2
Cloridrato de 2-clorometil3,5-dimetil4--metoxipiridina	86604-75-3	Sólido	2,7	Categoria 2	Categoria 2
Dissulfureto de di-n-propilo	*629-19-6*	*Líquido*	*3*	*Nenhuma*	*Categoria 2*
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 5 %)	1310-58-3	Líquido	3	Categoria 2	Categoria 2
5-(1,1-Dimetiletil)-2-metilbenzenotiol	7340-90-1	Líquido	3,3	Categoria 2	Categoria 2
1-Metil3-fenil1-piperazina	5271-27-2	Sólido	3,3	Categoria 2	Categoria 2
Heptanal	111-71-7	Líquido	3,4	Categoria 2	Categoria 2
Tetracloroetileno	127-18-4	Líquido	4	Categoria 2	Categoria 2

[1] Critérios de seleção dos produtos químicos: i) disponibilidade comercial, ii) representatividade no que respeita a toda a gama da escala de irritação de Draize (de não irritante a fortemente irritante), iii) estrutura química bem definida, iv) representatividade ao nível das classes funcionais utilizadas no processo de validação e v) exclusão de perfis extremamente tóxicos (por exemplo, carcinogenicidade ou toxicidade para o aparelho reprodutor) e de custos de eliminação proibitivos.

[2] Produtos químicos irritantes no coelho, mas comprovadamente não irritantes do ser humano (31) (32) (33).

[3] No âmbito do sistema GHS da ONU, mas não do sistema CRE da UE.

III) **Valores definidos de fiabilidade e de exatidão**

8. A fim de se determinar a fiabilidade e adequação de métodos similares ou modificados propostos, a transferir entre laboratórios, é necessário ensaiar os 20 produtos químicos de referência constantes do quadro 1 em, pelo menos, três laboratórios. Todavia, se o método proposto se destinar a ser utilizado apenas num laboratório, a validação não carece do ensaio em vários laboratórios. É, no entanto, essencial que os estudos de validação sejam avaliados de forma independente por organismos de validação reconhecidos a nível internacional, em observância das diretrizes internacionais (9). É necessário ensaiar em cada laboratório os 20 produtos químicos de referência, em três séries de ensaios independentes, com lotes de tecidos diferentes e suficientemente intervalados em termos cronológicos. Cada série consiste no ensaio em paralelo de, pelo menos, três replicados de tecidos por produto químico, controlo negativo e controlo positivo.

9. O cálculo dos valores de fiabilidade e de exatidão do método proposto deve ter em conta os quatro critérios a seguir indicados, a fim de garantir o cálculo coerente dos valores de fiabilidade e de adequação do modo previamente definido.

   1. No cálculo da capacidade de previsão (exatidão) e da variabilidade intra e interlaboratoriais do método, apenas podem utilizar-se dados de séries de ensaios completas.

   2. Para se estabelecer a classificação final da cada produto químico de referência em cada laboratório participante, utiliza-se o valor médio de viabilidade correspondente aos vários ensaios das séries de ensaios completas.

   3. No cálculo da variabilidade interlaboratorial do método, apenas podem ser utilizados dados correspondentes a produtos químicos para os quais tenham sido completadas séries de ensaios em todos os laboratórios participantes.

   4. O cálculo dos valores de exatidão é efetuado com base nas previsões efetuadas em cada laboratório participante, para os 20 produtos químicos de referência.

   Neste contexto, entende-se por "**série de ensaios**" três ensaios independentes efetuados num laboratório a um produto químico em estudo. Entende-se por "**série de ensaios completa**" uma sequência de três ensaios válidos, efetuada num laboratório, a um produto químico em estudo. Significa isto que um ensaio inválido invalida toda a série de três ensaios efetuados em sequência.

Reprodutibilidade intralaboratorial

10. Ao determinar a reprodutibilidade intralaboratorial num laboratório, a concordância, nesse laboratório, das classificações (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e nenhuma categoria) obtidas em séries de ensaios diferentes e independentes realizadas aos 20 produtos químicos de referência deve ser igual ou superior a 90 %.

Reprodutibilidade interlaboratorial

11. Se o método de ensaio proposto se destinar a ser utilizado num único laboratório, não é necessário determinar a reprodutibilidade interlaboratorial. No caso dos métodos a transferir para outros laboratórios, a concordância entre – de preferência – pelo menos três laboratórios nas classificações (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e nenhuma categoria) obtidas em séries de ensaios diferentes e independentes realizadas aos 20 produtos químicos de referência deve ser igual ou superior a 80 %.

Capacidade de previsão (exatidão)

12. A exatidão (sensibilidade, especificidade e exatidão global) do método similar ou modificado proposto deve ser comparável à do método de referência validado ou melhor do que a deste, tendo em conta dados adicionais sobre a adequação à espécie em causa (quadro 2). A sensibilidade deve ser igual ou superior a 80 % (2) (8) (23). Todavia, a sensibilidade do método *in vitro* proposto é objeto de uma restrição suplementar específica: a classificação "nenhuma categoria" só pode ser erradamente atribuída por mais de um laboratório participante a dois produtos químicos da categoria 2 *in vivo* (*1-decanol* e *dissulfureto de di-n-propilo*). A especificidade deve ser igual ou superior a 70 % (2) (8) (23). Não há outras restrições à especificidade do método *in vitro* proposto, ou seja, qualquer laboratório participante pode classificar erradamente um produto químico na rubrica "nenhuma categoria" *in vivo*, desde que a especificidade final do método de ensaio se situe no intervalo aceitável. A exatidão global deve ser igual ou superior a 75 % (2) (8) (23). Embora a sensibilidade do método de referência validado, calculada para os 20 produtos químicos de referência constantes da lista do quadro 1, seja de 90 %, fixou-se em 80 % a sensibilidade mínima exigida a qualquer método similar ou modificado para que se considere válido, pois tanto o *1--decanol* (produto químico inconclusivo) como o *dissulfureto de di-n-propilo* (falso negativo no método de referência validado) são reconhecidamente não-irritantes para o ser humano (31) (32) (33), apesar de os resultados do ensaio no coelho levarem a considerá-los irritantes. Uma vez que os modelos de epiderme humana reconstruída se baseiam em células humanas, podem considerar ambos os produtos químicos "não-irritantes" (rubrica "nenhuma categoria" no sistema GHS da ONU/CRE da UE).

Quadro 2

Valores de capacidade de previsão exigidos, em termos de sensibilidade, especificidade e exatidão global, para que um método similar ou modificado seja considerado válido.

Sensibilidade	Especificidade	Exatidão global
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Critérios de aceitação do estudo

13. Pode dar-se o caso de um ou mais ensaios, relativos a um ou mais produtos químicos em estudo, não cumprirem os critérios de aceitação dos ensaios no que respeita ao(s) produto(s) químico(s) em estudo ou de controlo ou não serem aceitáveis por outras razões. Para substituir os dados em falta, é admissível a realização de, no máximo, dois ensaios suplementares ("reensaio") por produto químico em estudo. Assim, uma vez que, em caso de reensaio, também é necessário ensaiar em paralelo os produtos químicos de controlo positivo e negativo, pode efetuar-se um máximo de duas séries de ensaios suplementares por cada produto químico em estudo.

14. Pode também dar-se o caso de, mesmo depois do reensaio, não ser possível obter o mínimo de três séries válidas, exigido para cada produto químico estudado, no respeitante a todos os produtos químicos de referência e a todos os laboratórios participantes, daí resultando uma matriz de dados incompleta. Nessa eventualidade, os dados obtidos poderão ser considerados aceitáveis se forem cumpridos os três critérios seguintes:

    1. Foi completada pelo menos uma série de ensaios para cada um dos 20 produtos químicos de referência.

    2. Em todos os laboratórios participantes (no mínimo três), foram completadas, pelo menos, 85 % das séries de ensaios (sendo 20 o número de produtos químicos, admitem-se 3 séries de ensaios inválidas por laboratório).

    3. Foram completadas, no mínimo, 90 % de todas as séries de ensaios possíveis em, pelo menos, três laboratórios (sendo 20 o número de produtos químicos ensaiados em 3 laboratórios, admitem-se no total 6 séries de ensaios inválidas).»

3. São aditados os seguintes capítulos:

«**B.49. ENSAIO *IN VITRO* DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

INTRODUÇÃO

1. O ensaio *in vitro* de micronúcleos é um ensaio de genotoxicidade para a deteção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem provir de fragmentos cromossómicos acêntricos (ou seja, sem centrómero) ou de cromossomas completos incapazes de migrar para os pólos durante a anáfase da divisão celular. O ensaio deteta a atividade de produtos químicos (substâncias e misturas) clastogénicos e aneugénicos (1) (2) em células que se tenham dividido durante ou após a exposição à substância em estudo. Este método de ensaio admite a utilização de protocolos que recorrem ou não ao inibidor de polimerização da actina "citocalasina B". A adição de citocalasina B antes da mitose visada permite a identificação e a análise seletiva da frequência de micronúcleos nas células que sofreram uma mitose, visto que são células binucleadas (3) (4). Este método de ensaio também admite a utilização de protocolos sem a parte de citocinese, desde que a população celular analisada tenha comprovadamente sofrido mitose.

2. Além da utilização do ensaio *in vitro* de micronúcleos para identificar produtos químicos (substâncias e misturas) indutores da formação de micronúcleos, o recurso ao bloqueio da citocinese, à marcação imunoquímica dos cinetócoros ou à hibridação com sondas centroméricas/teloméricas (hibridação fluorescente *in situ* ou "FISH") pode também fornecer informações sobre os mecanismos de indução de danos cromossomáticos e de formação de micronúcleos (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). É possível recorrer-se à marcação ou à hibridação referidas sempre que se verifique um aumento da formação de micronúcleos e o investigador pretenda determinar se este se deve a clastogénese, a aneugénese ou a ambas.

3. Os micronúcleos representam danos transmitidos às células-filhas, ao passo que as aberrações cromossomáticas contadas nas células em metáfase podem não ser transmitidas. Uma vez que é possível determinar, com relativa objetividade, os micronúcleos das células em interfase, o pessoal do laboratório apenas precisa de determinar se as células se dividiram ou não e quantas contêm micronúcleos. Por conseguinte, as contagens das preparações podem ser feitas com relativa rapidez e as análises podem ser automatizadas. É assim possível efetuar contagens a milhares – e já não centenas – de células por tratamento, aumentando as potencialidades do ensaio. Por outro lado, uma vez que podem formar-se micronúcleos devido a cromossomas que ficam para trás ("*lagging*"), é possível detetar agentes indutores de aneuploidia, que são difíceis de estudar em ensaios convencionais de aberrações cromossomáticas, por exemplo, o *Test Guideline* 473 da OCDE (capítulo B.10 deste anexo) (17). Todavia, sem recurso a técnicas especiais, como o método FISH referido no ponto 2, o ensaio *in vitro* de micronúcleos não permite distinguir os produtos químicos indutores de poliploidia dos indutores de clastogenicidade.

4. O ensaio *in vitro* de micronúcleos utiliza normalmente células de cultura, humanas ou de roedores. O método proporciona uma base alargada para a investigação *in vitro* de potenciais de indução de danos cromossomáticos, pois permite detetar aneugénios e clastogénios.

5. O ensaio *in vitro* de micronúcleos funciona bem numa grande variedade de tipos de células, na presença ou na ausência de citocalasina B. Há numerosos dados que confirmam a validade deste ensaio com várias linhagens de células de roedores (CHO, V79, CHL/IU e L5178Y) e de linfócitos humanos (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). É o caso, nomeadamente, dos estudos internacionais de validação coordenados pela *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) e dos relatórios do *International Workshop on Genotoxicity Testing* (4) (16). Os dados disponíveis foram também reavaliados num estudo de validação retrospetivo de suficiência de prova efetuado pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) da Comissão Europeia, tendo o ESAC (Comité Científico Consultivo do ECVAM) (32) (33) (34) considerado o método de ensaio cientificamente válido. Embora não tenham sido utilizadas nos estudos de validação, está descrita a utilização da linhagem de linfoblastóides humanos TK6 (35), de células HepG2 (36) (37) e de células embrionárias primárias de hámster sírio (*Mesocricetus auratus*) (38).

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Os ensaios *in vitro* necessitam, normalmente, de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação às substâncias em estudo. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*. Deve ter-se também o cuidado de evitar condições passíveis de gerarem resultados falsos positivos que não sejam reflexo de mutagenicidade intrínseca, mas que possam resultar, por exemplo, de fatores como mudanças pronunciadas do pH ou da pressão osmótica, bem como de níveis elevados de citotoxicidade (39) (40) (41). Se a adição do produto químico em estudo modificar o pH do meio, este deve ser regulado, de preferência tamponando a solução de reserva, a fim de que o volume seja sempre o mesmo, sejam quais forem as concentrações em estudo e os controlos utilizados.

8. Para analisar a indução de micronúcleos, é essencial que tanto as culturas tratadas como as culturas não tratadas tenham sofrido mitose. A etapa mais informativa para a contagem de micronúcleos corresponde às células que tenham sofrido uma mitose durante ou após o tratamento com a substância em estudo.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

9. Expõem-se culturas de células humanas ou de mamíferos à substância em estudo, juntamente com uma fonte exógena de ativação metabólica e sem essa fonte, a menos que se utilizem células com capacidade metabólica adequada. Incluem-se em todos os ensaios, em paralelo, produtos químicos de controlo positivo e controlos do solvente/excipiente.

10. Durante ou após a exposição à substância em estudo, cultivam-se as células por um período suficiente para que ocorram danos nos cromossomas ou nos fusos que levem à formação de micronúcleos nas células em interfase. Para indução de aneuploidia, a substância em estudo deve normalmente estar presente durante a mitose. Colhem-se células em interfase, coloram-se e analisam-se, para pesquisar a presença de micronúcleos. Idealmente, só devem contar-se micronúcleos em células que tenham sofrido mitose completa durante a exposição à substância em estudo ou durante o período pós-exposição, caso exista. Para o efeito, nas culturas que tenham sido tratadas com um bloqueador da citocinese, a contagem só é feita nas células binucleadas. Na ausência de um bloqueador da citocinese, é importante demonstrar a probabilidade elevada de que as células analisadas se tenham dividido durante ou após a exposição à substância em estudo. Em todos os protocolos, é importante demonstrar a ocorrência de proliferação celular tanto nas culturas tratadas como nas culturas de controlo, procedendo-se à contagem de micronúcleos para determinar o grau de citotoxicidade ou de citóstase induzido pela substância em estudo nas culturas (ou culturas em paralelo).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparação

11. Podem utilizar-se linfócitos primários cultivados de sangue humano periférico (5) (19) (42) (43) e uma série de linhagens celulares de roedores, como CHO, V79, CHL/IU e L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Se forem utilizadas outras linhagens celulares ou outros tipos de células, será necessário justificá-lo com base no seu desempenho comprovado no ensaio, em conformidade com a secção "Critérios de aceitabilidade". Uma vez que a frequência de fundo de micronúcleos influencia a sensibilidade do ensaio, recomenda-se a utilização de tipos de células cuja frequência de fundo de formação de micronúcleos seja baixa e estável.

12. Os linfócitos de sangue humano periférico devem provir de indivíduos jovens (18 a 35 anos), saudáveis e não fumadores, em relação aos quais não haja notícia de terem estado expostos recentemente a radiações ou produtos químicos genotóxicos. Se forem reunidas para utilização células de mais do que um dador, deve indicar-se o número de dadores. A frequência de micronúcleos aumenta com a idade, sendo esta tendência mais pronunciada no sexo feminino do que no sexo masculino (44), o que deve ser tido em conta na seleção de células de dadores para um banco de células.

Meios e condições de cultura

13. Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados, no que respeita ao tipo de recipiente, à concentração de CO_2, à temperatura e à humidade. As linhagens celulares e estirpes estabelecidas devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas, não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. Deve conhecer-se o tempo normal do ciclo celular nas condições de cultivo utilizadas no laboratório. Caso se recorra ao método do bloqueio da citocinese, deve otimizar-se a concentração do inibidor de citocinese para o tipo de célula em causa e demonstrar-se que a mesma produz um bom rendimento de células bionucleadas para contagem.

Preparação das culturas

14. Linhagens e estirpes de células estabelecidas: repicam-se células de culturas de reserva, inoculam-se num meio de cultura, com uma densidade que evite a confluência das colónias, no caso das monocamadas, ou de modo a não se atingirem densidades excessivas antes da colheita, no caso das culturas em suspensão, e incuba-se a 37 °C.

15. Linfócitos: cultiva-se sangue integral, tratado com um anticoagulante (por exemplo, heparina), ou linfócitos separados, na presença de um agente mitogénico (por exemplo, fito-hemaglutinina – PHA), antes da exposição à substância em estudo e à citocalasina B.

Ativação metabólica

16. Se forem utilizadas células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado é uma fração pós-mitocondrial reforçada com cofator (S9), preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, por exemplo, Aroclor 1254 (45) (46), ou uma mistura de fenobarbitona e β-naftoflavona (46) (47) (48) (49). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (50) nem ao Regulamento (CE) n.º 850/2004 relativo a poluentes orgânicos persistentes (66) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama dos 1 % a 10 % (v/v) no meio de ensaio final. O estado do sistema de ativação metabólica pode depender da classe do produto químico em estudo. Em alguns casos, pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações da fração S9.

17. As células utilizadas no estudo podem provir de linhagens celulares modificadas por engenharia genética que exprimam enzimas de ativação específicos, humanos ou de roedores, e dispensem, assim, um sistema de ativação metabólica exógeno. Nesses casos, a escolha das linhagens celulares utilizadas terá de ser justificada cientificamente – por exemplo, pela adequação das oxidases de função mista ao metabolismo da substância em estudo (51) e pela resposta das mesmas a clastogénios e aneugénios conhecidos (ver a secção "Critérios de aceitabilidade"). Deve ter-se presente que a substância em estudo pode não ser metabolizada pela(s) oxidase(s) de função mista expressa(s), caso no qual a ocorrência de resultados negativos não indicaria que a substância em estudo não é indutora de micronúcleos.

Preparação da substância em estudo

18. Os produtos químicos sólidos devem ser dissolvidos em solventes ou excipientes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células. Os produtos químicos líquidos podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou ser diluídos antes do tratamento. Para o ensaio de gases e produtos químicos voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipiente fechado (52) (53). Devem utilizar-se preparações frescas da substância em estudo, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem a aceitabilidade do seu armazenamento.

Condições de ensaio

Solventes/excipientes

19. O solvente/excipiente não deve reagir com a substância em estudo nem ser incompatível com a sobrevivência das células ou com a manutenção da atividade da fração S9 à concentração utilizada. Caso se utilizem solventes/ /excipientes cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas (em vez de, por exemplo, água, meio de cultura celular ou sulfóxido de dimetilo), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com a substância em estudo e a inexistência de genotoxicidade por parte do mesmo. Recomenda-se, sempre que possível, a utilização prioritária de solventes/excipientes aquosos.

Utilização de citocalasina B como bloqueador da citocinese

20. Um dos aspetos mais importantes a ponderar no desempenho do ensaio *in vitro* de micronúcleos é a necessidade de garantir que as células sujeitas à contagem sofreram mitose durante o tratamento ou durante o período de incubação após o tratamento, caso exista. A citocalasina B tem sido o agente mais utilizado para bloquear a citocinese, pois inibe a agregação da actina e impede assim a separação das células-filhas após a mitose, conduzindo à formação de células binucleadas (5) (54) (55). Pode, deste modo, circunscrever-se a contagem de micronúcleos às células que sofreram mitose durante ou após o tratamento. Pode medir-se simultaneamente o efeito da substância em estudo na cinética da proliferação celular. Quando se utilizam linfócitos humanos, é necessário recorrer a citocalasina B como bloqueador da citocinese, porque, caso contrário, os tempos do ciclo celular variariam de cultura para cultura e de dador para dador e nem todos os linfócitos responderiam ao PHA. Têm sido utilizados outros métodos – que são objeto do ponto 26 –, no ensaio de linhagens celulares, para determinar se as células sujeitas à contagem se dividiram.

21. O laboratório determina, para cada tipo de célula, a concentração necessária de citocalasina B para otimizar a frequência de células binucleadas nas culturas de controlo do solvente/excipiente. A concentração adequada de citocalasina B situa-se normalmente entre 3 e 6 μg/ml.

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade e escolha das concentrações de exposição

22. Ao determinar a concentração máxima a ensaiar da substância em estudo, devem evitar-se concentrações capazes de gerar respostas falsas positivas, como as que produzam citotoxicidade excessiva, precipitações no meio de cultura e alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (39) (40) (41).

23. Efetuam-se medições da proliferação celular para garantir que as células tratadas sofreram mitose durante o ensaio e que os tratamentos são efetuados a níveis adequados de citotoxicidade (ver o ponto 29). Se não se utilizar citocalasina B, determina-se a citotoxicidade com e sem ativação metabólica, nas células que exijam essa ativação, calculando o aumento relativo da contagem celular (RICC) ou a duplicação da população em termos relativos (RPD) – ver as fórmulas no apêndice 2. Caso se utilize citocalasina B, pode determinar-se a citotoxicidade calculando o índice de replicação (IR) – ver a fórmula no apêndice 2.

24. O tratamento das culturas com citocalasina B e a determinação das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e plurinucleadas na cultura celular constituem um método rigoroso de quantificação do efeito do tratamento na proliferação celular e da atividade citotóxica e citostática do mesmo (5), garantindo que apenas são contadas células que se dividiram durante ou após o tratamento.

25. Nos estudos com citocalasina B, a atividade citotóxica/citostática pode quantificar-se com base no índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) (5) (26) (56) ou ser determinada a partir do índice de replicação (IR) de, pelo menos, 500 células por cultura (ver as fórmulas no apêndice 2). Quando se utiliza citocalasina B para determinar a proliferação celular, o cálculo do CBPI ou do IR deve basear-se em, pelo menos, 500 células por cultura. A determinação destes parâmetros, entre outros, pode ser utilizada para estimar a citotoxicidade, comparando os valores correspondentes às culturas tratadas e de controlo. A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade (grau de confluência, número de células, apóptoses, necroses, contagem das células em metáfase, etc.) pode fornecer informações úteis.

26. Nos estudos em que não se recorra à citocalasina B, é necessário demonstrar que as células contadas na cultura sofreram divisão durante ou após o tratamento com a substância em estudo, pois, caso contrário, podem surgir respostas falsas negativas. Entre os métodos que têm sido utilizados para garantir que a contagem incide em células que se dividiram contam-se a incorporação e a deteção subsequente de bromodesoxiuridina (BrdU), para identificar as células que se replicaram (57), a formação de clones, quando se tratam e contam *in situ*, numa lâmina de microscópio, células de linhagens permanentes – índice de proliferação (IP) – (25) (26) (27) (28), a medição da duplicação da população em termos relativos (RPD) ou do aumento relativo da contagem celular (RICC) e outros métodos de eficácia comprovada (16) (56) (58) (59) (ver as fórmulas no apêndice 2). A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade ou de citóstase (grau de confluência, número de células, apóptoses, necroses, contagem das células em metáfase, etc.) pode fornecer informações úteis.

27. Devem avaliar-se, pelo menos, três concentrações de ensaio analisáveis. Para isso, pode ser necessário efetuar o ensaio utilizando um número maior de concentrações próximas e examinar a formação de micronúcleos nas concentrações que proporcionem a gama apropriada de citotoxicidades. Alternativamente, pode efetuar-se um ensaio preliminar de citotoxicidade, para reduzir o intervalo a utilizar no ensaio definitivo.

28. A concentração mais elevada deve gerar 55 % ± 5 % de citotoxicidade. Níveis mais elevados podem induzir, como efeito secundário da citotoxicidade, danos cromossomáticos (60). Caso esta ocorra, as concentrações escolhidas para o ensaio devem abranger a gama compreendida entre a concentração que produz 55 % ± 5 % de citotoxicidade e uma concentração que gere pouca ou nenhuma citotoxicidade.

29. Se não se observar citotoxicidade nem precipitação, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 0,01 M, 5 mg/ml ou 5 µl/ml. As concentrações escolhidas para análise devem, normalmente, estar separadas por um intervalo não superior a 10. No caso das substâncias cuja curva de resposta à concentração tenha um declive acentuado, pode ser necessário aproximar mais as concentrações da substância em estudo, a fim de se contarem também culturas sujeitas a toxicidade moderada e baixa.

30. Se a solubilidade constituir um fator limitante, a concentração máxima, caso o limite não seja imposto pela citotoxicidade, deve ser a menor concentração à qual se observe precipitação nas culturas, devendo esta ser mínima e não interferir na contagem. A avaliação da precipitação deve ser feita por métodos como a microscopia ótica, procurando detetar-se a persistência de precipitados (no final do tratamento) ou a formação de precipitados durante a cultura.

Controlos

31. Cada experiência deve incluir, em paralelo, controlos positivos e do solvente/excipiente, com e sem ativação metabólica.

32. São necessários controlos positivos para comprovar a capacidade das células e do protocolo de ensaio utilizados para identificar clastogénios e aneugénios e para garantir a capacidade metabólica da preparação S9. Devem utilizar-se no controlo positivo indutores reconhecidos da formação de micronúcleos, a concentrações que previsivelmente produzirão aumentos pequenos, mas reprodutíveis, em relação à linha de base e comprovarão a sensibilidade do sistema de ensaio. As concentrações do controlo positivo devem ser escolhidas de modo que os seus efeitos sejam claros, mas não permitam à pessoa que procede às leituras identificar imediatamente as lâminas codificadas.

33. Deve utilizar-se um clastogénio que necessite de ativação metabólica (por exemplo, ciclofosfamida ou benzo[*a*]pireno) para demonstrar a competência metabólica e a capacidade de deteção de clastogénios do sistema de ensaio. Caso se justifique, poderão ser utilizados outros controlos positivos. Uma vez que algumas substâncias de controlo positivo que necessitam de ativação metabólica podem ativar-se, sem recurso a fatores exógenos, em determinadas condições de tratamento ou com determinadas linhagens celulares, deve pesquisar-se a necessidade de ativação metabólica e a atividade da preparação S9 na linhagem celular escolhida e às concentrações selecionadas.

34. Presentemente, não se conhecem aneugénios que necessitem de ativação metabólica para manifestarem atividade genotóxica (16). A colchicina e a vimblastina são dois exemplos de substâncias atualmente aceites para controlo positivo da atividade aneugénica. Podem utilizar-se outros produtos químicos cuja indução de micronúcleos se deva apenas, ou essencialmente, à atividade aneugénica. Para evitar a necessidade de dois controlos positivos – de clastogenicidade e de aneugenicidade – sem ativação metabólica, o controlo de aneugenicidade pode servir de controlo positivo sem S9 e o controlo de clastogenicidade pode servir para verificar a adequação do sistema de ativação metabólica utilizado. No caso das células que não necessitem de S9, deve utilizar-se um controlo positivo para a clastogenicidade e outro para a aneugenicidade. Figuram no apêndice 3 algumas sugestões de produtos químicos de controlo positivo.

35. Se estiverem disponíveis produtos químicos adequados, é admissível a utilização de controlos positivos específicos das classes químicas correspondentes. Todos os produtos químicos de controlo positivo utilizados devem adequar-se ao tipo de célula e às condições de ativação em causa.

36. Devem incluir-se controlos do solvente/excipiente para cada período transcorrido até à colheita. Também deve incluir-se um controlo negativo (sem solvente/excipiente), não-tratado, a menos que estejam publicados dados ou que o laboratório disponha de dados históricos de controlo demonstrativos de que, às concentrações do solvente escolhido utilizadas, este não induz efeitos genotóxicos nem outros efeitos deletérios.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Esquema de tratamento

37. A fim de maximizar a probabilidade de deteção de ações aneugénicas ou clastogénicas num determinado estádio do ciclo celular, é importante tratar com a substância em estudo um número suficiente de células em todos os estádios do respetivo ciclo celular. O esquema de tratamento aplicado às linhagens celulares e às culturas de células primárias pode, portanto, diferir um pouco do aplicado aos linfócitos, que necessitam de estimulação mitogénica para iniciarem o seu ciclo celular. Este assunto é tratado nos pontos 41 a 43 (16).

38. De acordo com modelos teóricos e dados publicados (18), a maioria dos aneugénios e dos clastogénios é detetada com um tratamento curto durante três a seis horas, na presença ou ausência de S9, seguido da remoção da substância em estudo e de um período de cultura de 1,5 a 2,0 ciclos celulares (6). Procede-se à colheita de células decorrido um período correspondente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais (isto é, sem tratamento) após o início ou o termo do tratamento (ver o quadro 1). A cronologia da colheita das células e os tempos de recuperação podem ser dilatados, caso se saiba ou se suspeite que a substância em estudo afeta a duração do ciclo celular (por exemplo, ao ensaiar compostos nucleosídicos).

39. Devido à citotoxicidade potencial das preparações de S9 para as culturas de células de mamíferos, só na ausência deste se dilata o tempo de tratamento a um período correspondente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais. No caso desse tratamento prolongado, apresentam-se duas possibilidades de tratamento das células com o produto químico em estudo, na ausência ou na presença de citocalasina B. Essas possibilidades alternativas destinam-se a superar as situações em que se tema a eventual interação da substância em estudo com a citocalasina B.

40. Os esquemas propostos para o tratamento das células apresentam-se no quadro 1. Estes esquemas de tratamento gerais podem ser alterados em função da estabilidade ou reatividade da substância em estudo, ou das especificidades de crescimento das células utilizadas. Os tratamentos devem começar e terminar sempre durante a fase de crescimento exponencial das células. Para informações mais pormenorizadas sobre estes esquemas de tratamento, ver os pontos 41 a 47.

Quadro 1

Tratamento das células e cronologia da colheita de células no ensaio *in vitro* de micronúcleos

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratados com citocalasina B	+ S9	Tratamento de três a seis horas, na presença de S9; Remoção do S9 e do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.
	– S9 Exposição curta	Tratamento de três a seis horas; Remoção do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.
	– S9 Exposição prolongada	*Opção A:* Tratamento durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, na presença de citocalasina B; Colheita no termo do período de exposição; *Opção B:* Tratamento durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais; Remoção da substância em estudo; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.
Linhagens celulares tratadas sem citocalasina B (Procede-se de modo idêntico ao acima descrito, exceto que não se adiciona citocalasina B.)		

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratadas com citocalasina B

41. Relativamente aos linfócitos, a melhor prática é iniciar a exposição à substância em estudo 44 a 48 horas após a estimulação com PHA, quando tiver desaparecido a sincronização de ciclos (5). No ensaio inicial, tratam-se as células durante três a seis horas com a substância em estudo, na ausência e na presença de S9. Remove-se o meio de tratamento e substitui-se este por meio fresco, ao qual se juntou citocalasina B. Procede-se à colheita de células depois de decorrido o período correspondente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

42. Se ambos os ensaios iniciais de tratamento curto (três a seis horas) derem resultados negativos ou inconclusivos, procede-se, a seguir, a um tratamento sem S9 com um período de exposição dilatado. Existem duas possibilidades de tratamento com o mesmo grau de aceitabilidade. Todavia, pode ser mais adequado seguir a opção A no caso dos linfócitos estimulados, cujo crescimento exponencial pode registar um abrandamento 96 horas após a estimulação. Por outro lado, no caso da opção B, as culturas de células não devem ainda coalescer quando da colheita de células final.

— Opção A: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais; colheita de células no final do tempo de tratamento.

— Opção B: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais. Remoção do meio de tratamento e substituição deste por meio fresco; colheita de células depois de transcorridos 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais suplementares.

43. O tratamento de células primárias e de linhagens celulares é idêntico ao descrito para os linfócitos, exceto que não é necessário estimulá-los com PHA durante 44 a 48 horas. As células que não sejam linfócitos devem ser expostas de maneira que, no final do estudo, o seu crescimento ainda seja exponencial.

Linhagens celulares tratadas sem citocalasina B

44. Tratam-se as células durante três a seis horas, na ausência e na presença de S9. Remove-se o meio de tratamento e substitui-se este por meio fresco. Procede-se à colheita de células depois de decorrido o período correspondente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

45. Se ambos os ensaios iniciais de tratamento curto (três a seis horas) derem resultados negativos ou inconclusivos, procede-se a seguir a um tratamento (sem S9) com um período de exposição dilatado. Existem duas possibilidades de tratamento com o mesmo grau de aceitabilidade:

— Opção A: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais; colheita de células no final do tempo de tratamento.

— Opção B: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais. Remoção do meio de tratamento e substituição deste por meio fresco; colheita de células depois de decorridos 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

46. No final do tratamento de três a seis horas, podem estar presentes células mitóticas em monocamadas (identificáveis pela sua forma arredondada e por se destacarem da superfície). Por se destacarem com facilidade, estas células podem perder-se quando da remoção do meio com a substância em estudo. Devem tomar-se as precauções necessárias para recolher essas células ao lavar as culturas e para as repor com estas, de modo a evitar perdas de células que se encontrem em mitose, e eventualmente em processo de formação de micronúcleos, no processo de colheita de células.

Número de culturas

47. Devem utilizar-se culturas em duplicado para cada concentração da substância em estudo, assim como para o excipiente/solvente e o controlo negativo. Quando os dados históricos do laboratório mostrarem que a diferença entre os duplicados das culturas é mínima, admite-se a utilização de uma só cultura. Nesse caso, recomenda-se a análise de mais concentrações.

Colheita de células e preparação das lâminas

48. As células de cada cultura são colhidas e manipuladas separadamente. A preparação das células pode incluir um tratamento hipotónico, mas tal não é necessário de for possível obter uma dilatação adequada das células por outra via. Podem utilizar-se várias técnicas na preparação das lâminas, desde que se obtenham preparações celulares de alta qualidade para a contagem. Deve conservar-se o citoplasma das células, a fim de possibilitar a deteção dos micronúcleos e (no método com bloqueio da citocinese) uma identificação fiável das células binucleadas.

49. A coloração das lâminas pode fazer-se por vários métodos, por exemplo, com o corante Giemsa ou corantes fluorescentes específicos do ADN. A utilização de um corante específico do ADN – por exemplo, laranja de acridina (61) ou uma combinação do corante 33258 da Hoechst e de pironina-Y (62) – pode eliminar alguns erros associados à utilização de corantes inespecíficos do ADN. Se houver interesse em obter informações sobre os mecanismos de formação dos micronúcleos, podem utilizar-se na identificação do conteúdo destes (cromossomas/ /fragmentos de cromossomas) anticorpos anticinetócoros, o método FISH com sondas pancentroméricas de ADN ou a marcação *in situ* com iniciadores pancentroméricos específicos, em combinação com uma coloração de contraste adequada do ADN (15) (16). Na diferenciação entre clastogénios e aneugénios, podem utilizar-se outros métodos cuja eficácia tenha sido demonstrada.

Análise

50. Antes da análise microscópica, codificam-se todas as lâminas independentemente, incluindo as do solvente/excipiente e as dos controlos. Outra possibilidade de análise das amostras codificadas consiste em utilizar um sistema automático validado de análise de imagens, ou de citometria em fluxo.

51. Nas culturas de células tratadas com citocalasina B, analisa-se a frequência de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células binucleadas por concentração (havendo duas culturas por concentração, examinam-se no mínimo 1 000 células binucleadas por cultura). Se houver apenas uma cultura por concentração, deve proceder-se à contagem em, pelo menos, 2 000 células binucleadas dessa cultura. Se o número de células disponível para contagem, em cada concentração, for substancialmente inferior a 1 000 células binucleadas por cultura – ou substancialmente inferior a 2 000 células binucleadas, se houver apenas uma cultura – e não se detetar um aumento significativo de micronúcleos, deve repetir-se o ensaio, utilizando mais células ou a concentrações menos tóxicas, conforme seja mais conveniente. Devem ser tomadas precauções para não se contarem células binucleadas com formas irregulares ou cujos núcleos tenham dimensões muito diferentes. Também não devem tomar-se células plurinucleadas com dilatação insuficiente por células binucleadas. Não devem pesquisar-se micronúcleos em células com mais de dois núcleos principais, cuja frequência normal de micronúcleos pode ser mais elevada (63) (64). Admite-se a contagem em células mononucleadas se a substância em estudo interferir comprovadamente com a atividade da citocalasina B.

52. Nas linhagens celulares ensaiadas sem tratamento com citocalasina B, procede-se à contagem de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células por concentração (havendo duas culturas por concentração, examinam-se no mínimo 1 000 células binucleadas por cultura). Se houver apenas uma cultura por concentração, deve proceder-se à contagem em, pelo menos, 2 000 células dessa cultura.

53. Quando se utiliza citocalasina B, devem utilizar-se, pelo menos, 500 células por cultura para calcular o CBPI ou o índice de replicação, a fim de determinar a proliferação celular (ver o apêndice 2). Se os tratamentos forem efetuados sem citocalasina B, é essencial demonstrar que as células contadas passaram pelo processo de proliferação, como se referiu nos pontos 24 a 27.

Critérios de aceitabilidade

54. Os laboratórios que pretendam utilizar o ensaio *in vitro* de micronúcleos descrito no presente método devem demonstrar ser capazes de detetar, com fiabilidade e exatidão, produtos químicos com atividade aneugénica ou clastogénica reconhecida, com ou sem ativação metabólica, bem como produtos químicos com reação reconhecidamente negativa, utilizando os produtos químicos de referência do apêndice 3. Como prova de capacidade de execução do presente método, caso o ensaio seja realizado sem adição de citocalasina B, o laboratório deve demonstrar que as células nas quais se efetua a contagem de micronúcleos completaram uma divisão celular.

55. Recomendam-se como produtos de referência os produtos químicos indicados no apêndice 3. Podem substituir-se produtos químicos da lista, ou nela incluir outros, se a atividade desses produtos for conhecida, se induzirem a formação de micronúcleos pelos mesmos mecanismos de ação e também se forem comprovadamente adequados aos produtos químicos a ensaiar pelo método de ensaio *in vitro* de micronúcleos. A justificação a apresentar pode incluir um estudo de validação com uma vasta gama de substâncias ou centrado numa gama mais estreita, baseada na classe química da substância ou no mecanismo indutor de danos em estudo.

56. As frequências de micronúcleos no controlo do solvente/excipiente e nas culturas não tratadas devem ser constantemente baixas e reprodutíveis (normalmente 5 a 25 micronúcleos por milhar de células, para os tipos de células referidos no ponto 11). Outros tipos de células podem apresentar outras gamas de resposta, a determinar no processo de validação dos mesmos para o método de ensaio *in vitro* de micronúcleos. Os dados dos controlos positivo, negativo e do solvente devem ser utilizados para estabelecer gamas históricas para os controlos. Esses valores são utilizados para decidir se um controlo negativo/positivo efetuado em paralelo é ou não adequado a uma determinada experiência.

57. Se forem propostas pequenas alterações do protocolo para o ensaio (por exemplo, recurso a técnicas automáticas de contagem, em vez de técnicas não automáticas, ou utilização de um novo tipo de células), o protocolo modificado só pode considerar-se aceitável depois de se demonstrar que a alteração é adequada. Essa demonstração inclui prova da possibilidade de detetar os principais mecanismos de cisão, aquisição ou perda cromossomática, bem como de obter resultados positivos e negativos adequados para a classe da substância – ou a gama alargada de substâncias – a estudar.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

58. Se for utilizada a técnica do bloqueio da citocinese, a avaliação da indução de micronúcleos deve basear-se apenas na frequência de células binucleadas que possuam micronúcleos, independentemente do número de micronúcleos por célula. A contagem do número de células com um, dois ou mais micronúcleos pode fornecer informações úteis, mas não é obrigatória.

59. Também devem ser medidas, em paralelo, a citotoxicidade e/ou a citóstase em todas as culturas tratadas e nas culturas de controlo do solvente/excipiente (58). Para medir o atraso do ciclo celular quando se recorre ao método do bloqueio da citocinese, calcula-se o CBPI e o índice de replicação de todas as culturas tratadas e de controlo. Se não se adicionar citocalasina B, determina-se a duplicação da população em termos relativos (RPD), o aumento relativo da contagem celular (RICC) ou o índice de proliferação (PI) – ver o apêndice 2.

60. Os dados devem ser fornecidos por cultura e resumidos em quadros.

61. A indução de micronúcleos, por produtos químicos com esse efeito, nos ensaios *in vitro* pode dever-se a cisão ou perda cromossomática ou a ambos os efeitos. Para aprofundar se o mecanismo da indução de micronúcleos se deve a uma atividade clastogénica e/ou aneugénica, pode recorrer-se a métodos de análise que utilizam anticorpos anticinetócoros, sondas centroméricas específicas *in situ* ou outros.

Avaliação e interpretação dos resultados

62. No caso de resultados claramente positivos ou negativos, não são exigidos ensaios adicionais de confirmação. Os resultados inconclusivos podem ser clarificados analisando mais 1 000 células, de todas as culturas, para que os ensaios não percam o seu caráter cego. Se, ainda assim, não for possível esclarecer o resultado, será necessário efetuar mais ensaios. Nessa eventualidade, será de ponderar a modificação dos parâmetros do estudo, alargando ou estreitando a gama de condições, conforme se justifique. Os parâmetros do estudo que podem ser alterados incluem o espaçamento das concentrações ensaiadas, a cronologia do tratamento e da colheita de células e/ou as condições da ativação metabólica.

63. Existem vários critérios para determinar se um resultado é positivo, nomeadamente um aumento do número de células com micronúcleos em função da concentração ou com significado estatístico. O primeiro aspeto a ponderar é o significado biológico dos resultados. Ao avaliar se a resposta obtida tem significado em termos biológicos, pode constituir fator de orientação verificar se os valores observados se situam dentro ou fora da gama historicamente abrangida pelos controlos. Para facilitar a avaliação dos resultados dos ensaios, podem utilizar-se métodos estatísticos adequados (65). Todavia, devem avaliar-se resultados estatísticos associados à resposta à dosagem. Também devem ser tidos em conta os dados históricos e de reprodutibilidade.

64. Embora a maior parte dos ensaios dê resultados claramente positivos ou negativos, em alguns casos os dados obtidos não permitem tirar conclusões definitivas acerca da atividade da substância em estudo. Essas respostas inconclusivas ou questionáveis podem ocorrer independentemente do número de vezes que o ensaio for repetido.

65. Um resultado positivo num ensaio *in vitro* de micronúcleos indica que a substância em estudo induz cisões ou perdas cromossomáticas em células de mamíferos em cultura. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz cisões, aquisições ou perdas cromossomáticas em células de mamíferos em cultura.

Relatório do ensaio

66. O relatório do ensaio deve incluir, pelo menos, as informações seguintes que sejam pertinentes no estudo realizado:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*) e número CE,

— natureza física e grau de pureza,

— propriedades físico-químicas pertinentes para o estudo,

— reatividade do produto com o solvente/excipiente ou com o meio de cultura das células;

Solvente/excipiente:

— justificação da escolha do solvente/excipiente,

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/excipiente;

Células:

— tipo e origem das células utilizadas,

— adequação do tipo de célula utilizado,

— ausência de micoplasmas, quando aplicável,

— dados relativos à duração do ciclo celular, ao tempo de duplicação e ao índice de proliferação,

— caso sejam utilizados linfócitos, sexo, idade e número dos dadores de sangue, se pertinente,

— caso sejam utilizados linfócitos, utilização de sangue integral ou de linfócitos separados,

— número de repicagens, quando aplicável,

— métodos de manutenção das culturas celulares, quando aplicável,

— número modal de cromossomas,

— duração normal (correspondente ao controlo negativo) do ciclo celular;

Condições de ensaio:

— identificação da substância bloqueante da citocinese eventualmente utilizada (por exemplo, citocalasina B), concentração da mesma e duração da exposição das células,

— justificação da seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo, quando disponíveis, dados de citotoxicidade e limitações de solubilidade,

— composição dos meios e, quando aplicável, concentração de CO_2,

— concentrações da substância em estudo,

— concentração (e/ou volume) do excipiente e da substância em estudo adicionados,

— tempo e temperatura de incubação,

— duração do tratamento,

— tempo decorrido entre o tratamento e a colheita das células,

— densidade celular da sementeira, quando aplicável,

— tipo e composição do sistema de ativação metabólica; critérios de aceitabilidade,

— produtos químicos de controlo positivo e controlos negativos,

— métodos de preparação das lâminas e técnica de coloração utilizada,

— critérios de identificação dos micronúcleos,

— números de células analisados,

— métodos de medição da citotoxicidade,

— outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade,

— critérios definidos para que os resultados do estudo sejam considerados positivos, negativos ou inconclusivos,

— método(s) de análise estatística utilizado(s),

— métodos (como a utilização de anticorpos anticinetócoros) para determinar se os micronúcleos contêm cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas, quando aplicável;

Resultados:

— métodos de medição da citotoxicidade utilizados, por exemplo, CBPI ou índice de replicação, no caso do recurso ao método do bloqueio da citocinese, ou RICC, RPD ou índice de proliferação, no caso contrário; outras observações, se pertinente (por exemplo, grau de confluência celular, apóptoses, necroses, contagem das células em metáfase, frequência de células binucleadas),

— sinais de precipitação,

— dados de pH e de pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados,

— definição das células aceitáveis para análise,

— distribuição das células mono, bi e plurinucleadas, se for utilizado um método de bloqueio da citocinese,

— número de células com micronúcleos, para cada cultura tratada e de controlo, especificando, caso se justifique, se se trata de células binucleadas ou mononucleadas,

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la,

— dados (concentrações e solventes) do controlo negativo (solvente/excipiente) e do produto químico de controlo positivo,

— dados históricos do controlo negativo (solvente/excipiente) e do produto químico de controlo positivo, indicando intervalos, médias, desvios-padrão e intervalos de confiança (por exemplo, 95 %),

— análise estatística; valores p (probabilidade de significância), caso sejam conhecidos;

Discussão dos resultados;

Conclusões.

REFERÊNCIAS

(1) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M., Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W., Wakata, A. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.

(6) Fenech, M., Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A., Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U., Adler, I.D. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C., Lo Jacono, F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis--blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S., Hasegawa, L.S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J., Bentley, K.S. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R., Crebelli, R. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W., Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

(17) OCDE (1997). *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [www.oecd.org/env/testguidelines].

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G., Marzin, D. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. III. Using CHO cells. *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. V. Using L5178Y cells. *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A., Locher, F. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V., Lorge, E. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D., Madle, S. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Res.*, 410, 81--116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W., Madle, S. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Res.*, 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P., Müller, L. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Res.*, 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H., Madle, S. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res.*, 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K., Sofuni, T. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, 14, 569-580.

(31) Elhajouji, A., Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25.ª reunião do ESAC, 16-17 de novembro de 2006. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(33) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys, P. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A., Sofuni, T. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M., Knasmeuller, S. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B.J. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J., Aardema, M.J. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J., Myhr, B.C. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.

(42) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.*, 37, 31-45.

(45) Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R., Zeiger, E. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M., Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., Sugimura, T. (1976). A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. *In* de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R., Philpot, R.M. (eds.), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R., Galloway, S.M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) PNUA (2001). Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Programa das Nações Unidas para o Ambiente (PNUA). Disponível em: [http://www.pops.int/].

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M., Parry, J.M. (1996). An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C., McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. *In* Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, p. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P., Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagenesis*, 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D., Norman, A. (1984). An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S., Kirkland, D. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Molec. Mutagenesis*, 35, 191-201.

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L., Lee, C. (2003). *In vitro* micronucleus test. *In* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, p. 463-467.

(66) Regulamento (CE) n.º 850/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo a poluentes orgânicos persistentes e que altera a Diretiva 79/117/CEE, JO L 229 de 30.4.2004, p. 5.

Apêndice 1

Definições

Aneugénio: Substância ou processo que, por interação com os componentes do ciclo mitótico ou meiótico de divisão celular, origina aneuploidia em células ou organismos.

Aneuploidia: Desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Apóptose: Morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas conducentes à desintegração das células em partículas envolvidas por membranas, que são em seguida eliminadas por fagocitose ou excreção.

Proliferação celular: Aumento do número de células por divisão celular mitótica.

Centrómero: Região do ADN de um cromossoma na qual os dois cromatídeos se juntam e à qual os dois cinetócoros estão ligados lado a lado.

Clastogénio: Substância ou processo causador de aberrações cromossomáticas estruturais em populações celulares ou organismos.

Citocinese: Processo de divisão celular imediatamente após a mitose, conducente à formação de duas células-filhas, cada uma com o seu núcleo.

Índice de proliferação com bloqueio da citocinese (em inglês "CBPI", de "cytokinesis-block proliferation index"): Proporção de células "segunda divisão" na população tratada, relativamente ao controlo não tratado (ver a fórmula no apêndice 2).

Citóstase: Inibição do crescimento celular (ver a fórmula no apêndice 2).

Citotoxicidade: Efeitos nocivos na estrutura ou na função celular que acabam por causar a morte da célula.

Genotóxico: Termo geral que abrange todos os tipos de danos ao ADN ou aos cromossomas, incluindo fratura, rearranjos por adução, mutações, aberrações cromossomáticas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossomáticos estáveis.

Célula em interfase: Célula que não está na fase mitótica.

Cinetócoro: Estrutura proteica formada no centrómero de um cromossoma, à qual se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os pólos das células-filhas.

Micronúcleo: Pequeno núcleo separado dos núcleos principais das células e que se adicionam a estes, formados durante a telófase da mitose ou meiose por fragmentos de cromossoma ou cromossomas inteiros que ficam para trás.

Mitose: Divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Índice mitótico: Relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população celular, que fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Mutagénico: Que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes, ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossomáticas).

Não disjunção: Falha de separação de cromatídeos emparelhados, que não são adequadamente segregados para as células-filhas em formação, originando células-filhas com número anormal de cromossomas.

Poliploidia: Aberrações cromossomáticas numéricas em células ou organismos, que abrangem uma ou mais séries completas de cromossomas – por oposição à aneuploidia, que abrange um ou mais cromossomas.

Índice de proliferação (IP): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Aumento relativo da contagem celular (em inglês "RICC", de "relative increase in cell count"): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Duplicação da população em termos relativos (em inglês "RPD", de "relative population doubling"): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Índice de replicação (IR): Proporção de ciclos de divisão celular completados numa cultura tratada, relativamente ao controlo não-tratado, durante o período de exposição e de recuperação (ver a fórmula no apêndice 2).

Produto químico em estudo (ou substância química em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Apêndice 2

Fórmulas de quantificação da citotoxicidade

1. *Caso se utilize citocalasina B*, a avaliação da citotoxicidade é feita com base no índice de proliferação com citocinese bloqueada (CBPI) ou no índice de replicação (IR) (16) (58). O primeiro indica o número médio de ciclos celulares por célula durante o período de exposição à citocalasina B, podendo ser utilizado para calcular a proliferação celular. O índice de replicação indica a relação entre o número de núcleos nas culturas tratadas e o número de núcleos nas culturas de controlo e pode ser utilizado para calcular a percentagem de citóstase:

$$\text{Percentagem de citóstase} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

em que:

T = se refere à cultura tratada com o produto químico em estudo,
C = se refere à cultura com o excipiente, de controlo,

e:

$$CBPI = \frac{\begin{array}{c}((\text{n.º de células mononucleadas}) + \\ (2 \times \text{n.º de células binucleadas}) + (3 \times \text{n.º de células plurinucleadas}))\end{array}}{(\text{número total de células})}$$

Por conseguinte, se o CBPI for igual a 1 (todas as células mononucleadas), a citóstase é de 100 %.

$$\text{Citóstase} = 100 - IR$$

$$RI = \frac{((\text{n.º de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células plurinucleadas})) \div (\text{n.º total de células})_T}{((\text{n.º de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células plurinucleadas})) \div (\text{n.º total de células})_C} \times 100$$

T = culturas tratadas,
C = culturas de controlo.

2. Por conseguinte, se o IR for de 53 %, em termos numéricos apenas 53 % das células que se dividiram para formar células binucleadas e plurinucleadas na cultura de controlo se dividiram na cultura tratada – o que corresponde a 47 % de citóstase.

3. *Caso não se utilize citocalasina B*, recomenda-se a avaliação da citotoxicidade com base no aumento relativo da contagem celular (RICC) ou na duplicação da população em termos relativos (RPD) (58), pois ambos os parâmetros têm em conta a proporção de células que sofreu divisão na população celular.

$$RICC = \frac{(\text{Aumento do número de células nas culturas tratadas (final – inicial)})}{(\text{Aumento do número de células nas culturas de controlo (final – inicial)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{Número de duplicações de população nas culturas tratadas})}{(\text{Número de duplicações de população nas culturas de controlo})} \times 100$$

em que:

$$\text{Duplicação da população} = [\log(\text{n.º de células após tratamento} \div \text{n.º inicial de células})] \div \log 2$$

4. A um RICC ou RPD de 53 % corresponde, pois, uma citotoxicidade/citóstase de 47 %.

5. Com base no índice de proliferação (IP), pode quantificar-se a citotoxicidade por contagem do número de clones constituídos por uma célula (cl1), duas células (cl2), 3 a 4 células (cl4) e 5 a 8 células (cl8):

$$IP = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. O índice de proliferação também tem sido utilizado como parâmetro fiável e efetivo de citotoxicidade para linhagens celulares cultivadas *in situ* sem citocalasina B (25) (26) (27) (28).

Apêndice 3

Produtos químicos de referência recomendados para avaliação de desempenhos [1]

Categoria	Produto químico	N.º CAS	N.º CE
1. Clastogénios ativos sem ativação metabólica			
	Arabinósido de citosina	147-94-4	205-705-9
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogénios que necessitam de ativação metabólica			
	Benzo[*a*]pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
3. Aneugénios			
	Colchicina	64-86-8	200-598-5
	Vimblastina	143-67-9	205-606-0
4. Substâncias negativas			
	Ftalato de bis(2-etil-hexilo)	117-81-7	204-211-0
	Ácido nalidíxico	389-08-2	206-864-7
	Pireno	129-00-0	204-927-3
	Cloreto de sódio	7647-14-5	231-598-3

[1] Os produtos químicos de referência indicados são os produtos químicos que se recomendam. Só podem substituir-se produtos químicos da lista, ou nela incluir outros, se a atividade desses produtos for conhecida, se induzirem a formação de micronúcleos pelos mesmos mecanismos de ação e também se forem comprovadamente adequados aos produtos químicos a ensaiar pelo método de ensaio *in vitro* de micronúcleos. Consoante a finalidade em vista, a justificação pode incluir também um estudo de validação com uma vasta gama de substâncias ou centrado numa gama mais estreita, baseada na classe química da substância ou no mecanismo indutor de danos em estudo.

B.50. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: DA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. O primeiro método de ensaio utilizado para determinar a sensibilização cutânea no rato – o ensaio de gânglios linfáticos locais (método LLNA, "*Local Lymph Node Assay*", *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) foi revisto (1). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) elementos pormenorizados sobre a validação do método LLNA, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. No método LLNA utiliza-se iodo radioativo ou timidina radioativa para medir a proliferação de linfócitos, pelo que o recurso a este ensaio está limitado sempre que a aquisição, utilização e eliminação de matérias radioativas seja problemática. O método "LLNA: DA" (desenvolvido pela Daicel Chemical Industries, Ltd.) é uma versão modificada do método LLNA: não utiliza matérias radioativas e permite determinar quantitativamente, por bioluminescência, o teor de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador da proliferação de linfócitos. O método foi validado e examinado, tendo sido recomendado por um painel de avaliação internacional constituído por peritos devido à sua utilidade para a identificação de produtos químicos sensibilizantes e não sensibilizantes da pele, com algumas limitações (10) (11) (12) (13). O método foi concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O capítulo B.6 deste anexo e o *Test Guideline* 406 da OCDE recorrem a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (14). O método LLNA (capítulo B.42 deste anexo, *Test Guideline* 429 da OCDE) e as duas alterações do mesmo que não recorrem a matérias radioativas (LLNA: DA – capítulo B.50 deste anexo, *Test Guideline* 442 A da OCDE – e LLNA: BrdU-ELISA – capítulo B.51 deste anexo, *Test Guideline* 442 B da OCDE) apresentam vantagens em relação aos ensaios na cobaia descritos no capítulo B.6 e no *Test Guideline* 406 da OCDE (14), traduzidas na redução e no aperfeiçoamento do recurso a animais.

2. O método LLNA: DA é similar ao método LLNA. Estuda a fase indutora da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Por outro lado, o facto de permitir detetar sensibilizantes cutâneos sem necessidade de utilizar marcadores radioativos do ADN elimina as questões potenciais em matéria de exposição profissional à radioatividade e de eliminação de resíduos. O presente método possibilita a utilização crescente de ratos na deteção de sensibilizantes cutâneos, o que facilita a redução do recurso a cobaias em ensaios de potencial de sensibilização cutânea (método B6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (14).

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA: DA é um método LLNA modificado para a identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele, com determinadas limitações. Isso não implica, necessariamente, que o método LLNA: DA deva ser sempre utilizado em substituição do método LLNA ou de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (14), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação (10) (11). Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA: DA se adequa à substância em estudo (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA: DA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA: DA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o recurso a animais para estes fins, quando comparado com os ensaios na cobaia (método B.6 e *Test Guideline* 406 da OCDE) (14). Além disso, proporciona melhorias substanciais (menos dor e sofrimento) no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto, uma vez que, ao contrário do método B.6 e do *Test Guideline* 406 da OCDE, não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Apesar das vantagens do método LLNA: DA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE (14), existem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos, por exemplo, para ensaiar determinados metais, em virtude dos resultados falsos positivos que se obtêm com certos irritantes cutâneos (como algumas substâncias tensioativas) (6) – 1 e capítulo B.42 do presente anexo – ou devido a problemas de solubilidade da substância em estudo. Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (16), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias – método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE (14). Relativamente ao método LLNA: DA, foi recomendado que se ponderem também as limitações identificadas para o método LLNA (1 e capítulo B.42 do presente anexo) (10). Acresce que o método LLNA: DA pode não ser adequado para ensaiar substâncias que afetem os níveis de ATP (por exemplo, substâncias inibidoras do ATP) ou que afetem a exatidão da medição do ATP intracelular (por exemplo, presença de enzimas que degradem o ATP ou de ATP extracelular no gânglio linfático). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA: DA é potencialmente aplicável ao ensaio de qualquer substância, a menos que esta possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método. Deve ainda ser ponderada a possibilidade de obtenção de resultados positivos próximos do limite caso os valores de índice de estimulação (IE) estejam compreendidos entre 1,8 e 2,5 (ver os pontos 31 e 32). Estas reticências baseiam-se nos dados de validação de 44 substâncias com índice de estimulação igual ou superior a 1,8 (ver o ponto 6), nas quais o método LLNA: DA identificou corretamente todas as 32 substâncias classificadas de sensibilizantes pelo método LLNA, mas identificou incorretamente três das 12 substâncias com índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5 (resultado positivo próximo do limite) classificadas de não sensibilizantes pelo método LLNA (10). Todavia, como se utilizou o mesmo conjunto de dados para fixar os valores de índice de estimulação e calcular as propriedades de previsão do ensaio, os resultados referidos podem traduzir uma sobrestimação das reais propriedades de previsão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA: DA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; essa razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 1,8. O presente método baseia-se na medição do teor de ATP por bioluminescência (reconhecidamente correlacionado com o número de células vivas) (17) como indicador do aumento do número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular (18) (19). O método de bioluminescência utiliza a enzima luciferase para catalisar a emissão de luz a partir de ATP e luciferina, de acordo com a seguinte reação:

$$ATP + luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + luz$$

A intensidade da luz emitida é medida com um luminómetro e é diretamente proporcional à concentração de ATP. O ensaio luciferina-luciferase é um método sensível de determinação quantitativa do ATP utilizado numa grande variedade de aplicações (20).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Os estudos de validação do método LLNA: DA foram efetuados exclusivamente com a estirpe CBA/J, que é portanto considerada a estirpe preferida (12) (13). Utilizam-se fêmeas adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre oito e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA: DA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (21), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Antes da aplicação nas orelhas dos ratos, os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de aplicarem o método LLNA: DA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA: DA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação ≥ 1,8 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 10). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % e eugenol (n.º CAS 97-53-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1. Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA: DA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA: DA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA: DA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (22).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (23). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo;

— características físico-químicas conhecidas;

— dados corroborantes do método LLNA: DA;

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (2) e (24). Selecionam-se normalmente as doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (24) (25). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N*,*N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (6), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 33). Por outro lado, só pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo se os dados forem obtidos por animal (22). Além disso, algumas autoridades reguladoras exigem a apresentação de dados por animal. A recolha regular de dados por animal é vantajosa segundo critérios de bem-estar animal, evitando a duplicação de ensaios que seria necessária se os resultados relativos à substância em estudo anteriormente recolhidos de outro modo (por exemplo, agregação de dados relativa a séries de animais) tivessem de ser examinados ulteriormente por autoridades reguladoras com outras exigências (por exemplo, dados individualizados por animal).

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA: DA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA: DA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA: DA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 8). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (25). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose), no dia 7 (24 horas antes do termo do ensaio) e no dia 8. Complementarmente, no dia 8 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais em qualquer dia de medição constituem indicadores de irritação local excessiva (26) (27). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA: DA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (26) (27), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (35), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA: DA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos, ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 8, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem grande sofrimento ou sinais de dor intensa devem ser eutanasiados (36).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha solução aquosa a 1 % de laurilsulfato de sódio, utilizando uma escova molhada nessa solução, de modo a cobrir a totalidade do dorso de cada orelha com quatro ou cinco pinceladas. Uma hora após o tratamento com esta solução de laurilsulfato de sódio, aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2, 3 e 7:* Repetir o pré-tratamento com a solução aquosa a 1 % de laurilsulfato de sódio e o procedimento de aplicação da substância em estudo efetuados no dia 1.

— *Dias 4, 5 e 6:* Nenhum tratamento.

— *Dia 8:* Anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Eutanasiar os animais 24 a 30 horas, aproximadamente, após o início da aplicação no dia 7. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em solução-tampão de fosfato (PBS), separadamente para cada animal. Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (22). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos colocando os gânglios excisados bilateralmente de cada rato entre duas lâminas de vidro e aplicando uma pressão ligeira, para os esmagar. Depois de confirmar que os tecidos exsudaram dos gânglios, separar cuidadosamente as duas lâminas. Colocar os tecidos de ambas as lâminas em suspensão em PBS, inclinando cada lâmina por cima de uma placa de Petri e lavando com PBS, enquanto se raspam os tecidos da lâmina com um raspador de células. Os gânglios linfáticos dos animais de controlo negativo são pequenos, pelo que é necessário proceder com cuidado para evitar efeitos artificiais nos valores do índice de estimulação. Deve utilizar-se 1 ml de PBS para lavar as duas lâminas. Utilizando o raspador de células, homogeneizar com cuidado a suspensão de células de gânglios linfáticos na placa de Petri. Com uma micropipeta, colher uma alíquota de 20 µl da suspensão dessas células, tendo o cuidado de não incluir a membrana, visível a olho nu. Misturar com 1,98 ml de PBS, para obter uma amostra de 2 ml. Preparar do mesmo modo uma segunda amostra de 2 ml, de maneira que se obtenham duas amostras por animal.

Determinação da proliferação celular (medição do teor de ATP dos linfócitos)

27. Mede-se o aumento do teor de ATP dos gânglios linfáticos recorrendo ao método da luciferina/luciferase utilizando um conjunto de medição de ATP, que mede a bioluminescência em unidades de luminescência relativa (ULR). O tempo que decorre entre a eutanásia do animal e a medição do teor de ATP que lhe corresponde deve ser uniforme, não devendo exceder cerca de 30 minutos, pois considera-se que o teor de ATP decresce gradualmente após a morte do animal (12). Assim, o processo compreendido entre a excisão dos gânglios linfáticos auriculares e a medição do ATP deve estar concluído ao fim de 20 minutos, seguindo uma cronologia pré-estabelecida idêntica para todos os animais. Mede-se a luminescência de ATP em cada amostra de 2 ml, obtendo-se, portanto, duas medições de ATP por animal. Determina-se então a luminescência média de ATP, cujo valor é subsequentemente utilizado nos cálculos (ver o ponto 30).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (36).

Pesos corporais

29. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação (EI) médio. Determina-se o índice de estimulação dividindo a média das unidades de luminescência relativa/rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pela média das unidades de luminescência relativa/rato do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1.

31. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 1,8 (10). Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite (índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5) deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (2), (3) (37).

32. No caso das respostas positivas próximas do limite, com índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5, pode ser útil aos utilizadores terem em conta, juntamente com os valores de índice de estimulação, informações adicionais como a resposta à dosagem, sinais de toxicidade sistémica ou de irritação excessiva e, se for caso disso, a significância estatística, para confirmar se os resultados obtidos são positivos (10). Devem examinar-se também as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (4) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

33. A recolha de dados para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o solvente/excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não-paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartando outros (por vezes denominados "aberrantes").

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em quadros, indicando os valores de ULR correspondentes a cada animal, a média de ULR/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do solvente/excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

35. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— origem, número de lote e dados de garantia de qualidade/controlo de qualidade do fabricante para o conjunto de medição do ATP,

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio, caso tenha sido efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos (solvente/excipiente) ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua morte programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo), para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— cronologia da morte e da medição do ATP, para cada animal,

— quadro de valores de ULR e de índices de estimulação para cada grupo de dosagem, por rato,

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) de ULR/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento,

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs//llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm].

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K., Ito, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A. (2008). Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OCDE (1992). Skin Sensitisation. Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J., Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T., Matsumoto, S. (1984). Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.

(21) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Science. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(23) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(25) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/ /BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European interlaboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(36) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(38) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo "concordância" são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (38).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Falso negativo: Substância incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa.

Falso positivo: Substância incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa.

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente, que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também se designa por "reprodutibilidade entre laboratórios" (38).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por "reprodutibilidade no laboratório" (38).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (38).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

B.51. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: BRDU-ELISA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. O primeiro método de ensaio utilizado para determinar a sensibilização cutânea no rato – o ensaio de gânglios linfáticos locais (método LLNA, "*Local Lymph Node Assay*", *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) foi revisto (1 e capítulo B.42 deste anexo). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) elementos pormenorizados sobre a validação do método LLNA, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. No método LLNA utiliza-se iodo radioativo ou timidina radioativa para medir a proliferação de linfócitos, pelo que o recurso a este ensaio está limitado sempre que a aquisição, utilização e eliminação de matérias radioativas for problemática. O método "LLNA: BrdU-ELISA" (ELISA: "*Enzyme--Linked Immunosorbent Assay*") é uma versão modificada do método LLNA: não utiliza matérias radioativas, recorrendo à 5-bromo2-desoxiuridina (BrdU) não-radioativa (n.º CAS 59-14-3) num sistema de ensaio ELISA para medir a proliferação de linfócitos. O método foi validado e examinado, tendo sido recomendado por um painel de avaliação científica internacional constituído por peritos independentes devido à sua utilidade para a identificação de produtos químicos sensibilizantes e não sensibilizantes da pele, com algumas limitações (10) (11) (12). O método foi concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O capítulo B.6 deste anexo e o *Test Guideline* 406 da OCDE recorrem a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (13). O método LLNA (capítulo B.42 deste anexo, *Test Guideline* 429 da OCDE) e as duas alterações do mesmo que não recorrem a matérias radioativas (LLNA: BrdU-ELISA – capítulo B.51 deste anexo, *Test Guideline* 442 B da OCDE – e LLNA: DA – capítulo B.50 deste anexo, *Test Guideline* 442 A da OCDE) apresentam vantagens em relação aos ensaios na cobaia descritos no capítulo B.6 e no *Test Guideline* 406 da OCDE (13), traduzidas na redução e no aperfeiçoamento do recurso a animais.

2. O método LLNA: BrdU-ELISA é similar ao método LLNA. Estuda a fase indutora da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Por outro lado, o facto de permitir detetar sensibilizantes cutâneos sem necessidade de utilizar marcadores radioativos do ADN elimina as questões potenciais em matéria de exposição profissional à radioatividade e de eliminação de resíduos. O presente método possibilita a utilização crescente de ratos na deteção de sensibilizantes cutâneos, o que facilita a redução do recurso a cobaias em ensaios de potencial de sensibilização cutânea (capítulo B6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13).

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA: BrdU-ELISA é um método LLNA modificado para a identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele, com determinadas limitações. Isso não implica, necessariamente, que o método LLNA: BrdU-ELISA deva ser sempre utilizado em substituição do método LLNA ou de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação (10) (11). Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios *in vitro* ou *in vivo* de toxicidade da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA: BrdU-ELISA se adequa à substância em estudo (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA: BrdU-ELISA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA: BrdU-ELISA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o recurso a animais para estes fins, quando comparado com os ensaios na cobaia (método B.6 e *Test Guideline* 406 da OCDE) (13). Além disso, proporciona melhorias substanciais no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto, uma vez que, ao contrário do método B.6 e do *Test Guideline* 406 da OCDE, não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Também não implica a utilização de nenhum adjuvante, ao contrário do que sucede no ensaio de maximização na cobaia (capítulo B.6 do presente anexo, 13), reduzindo a dor e o sofrimento causados aos animais. Apesar das vantagens do método LLNA: BrdU--ELISA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE (13), existem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos, por exemplo, para ensaiar certos metais, em virtude dos resultados falsos positivos que se obtêm com certos irritantes cutâneos (como algumas substâncias tensioativas) (6) – 1 e capítulo B.42 do presente anexo – ou devido a problemas de solubilidade da substância em estudo. Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (15), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias – método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE (13). Relativamente ao método LLNA: BrdU-ELISA, foi recomendado que se ponderam também as limitações identificadas para o método LLNA (1 e capítulo B.42 do presente anexo) (10). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA: BrdU-ELISA é potencialmente aplicável ao ensaio de qualquer produto químico, a menos que este possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método. Deve ainda ser ponderada a possibilidade de obtenção de resultados positivos próximos do limite caso os valores de índice de estimulação (IE) estejam compreendidos entre 1,6 e 1,9 (ver os pontos 31 e 32). Estas reticências baseiam-se nos dados de validação de 43 substâncias com índice de estimulação igual ou superior a 1,6 (ver o ponto 6), nas quais o método LLNA: BrdU-ELISA identificou corretamente todas as 32 substâncias classificadas de sensibilizantes pelo método LLNA, mas identificou incorretamente duas das 11 substâncias com índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9 (resultado positivo próximo do limite) classificadas de não-sensibilizantes pelo método LLNA (10). Todavia, como se utilizou o mesmo conjunto de dados para fixar os valores de índice de estimulação e calcular as propriedades de previsão do ensaio, os resultados referidos podem traduzir uma sobrestimação das reais propriedades de previsão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA: BrdU-ELISA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; esta razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 1,6. O presente método baseia-se na medição do teor de bromodesoxiuridina como indicador do aumento do número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular. A bromodesoxiuridina é um composto análogo da timidina e é similar o modo como se processa a sua incorporação no ADN das células em proliferação. Mede-se a incorporação da bromodesoxiuridina pelo método ELISA, que utiliza um anticorpo específico daquela também marcado com peroxidase. Ao adicionar-se o substrato, a peroxidase reage com este produzindo um produto corado, que é determinado quantitativamente, a uma absorvância específica, por meio de um leitor de placas de microtitulação.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Os estudos de validação do método LLNA: BrdU-ELISA foram efetuados exclusivamente com a estirpe CBA/JN, que é portanto considerada a estirpe preferida (10) (12). Utilizam-se fêmeas adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre oito e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA: BrdU-ELISA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (16), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Antes da aplicação nas orelhas dos ratos, os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de aplicarem o método LLNA: BrdU-ELISA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA: BrdU-ELISA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação ≥ 1,6 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 14). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % e eugenol (n.º CAS 97-53-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1. Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA: BrdU-ELISA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA: BrdU-ELISA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA: BrdU-ELISA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (17).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (18). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo;

— características físico-químicas conhecidas;

— dados corroborantes do método LLNA: BrdU-ELISA;

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um grupo de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (2) e (19). Selecionam-se normalmente as doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (19) (referência 20 e capítulo B.4 do presente anexo). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N*,*N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (6), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 33). Por outro lado, só pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo se forem obtidos dados por animal (17). Além disso, algumas autoridades reguladoras exigem a apresentação de dados por animal. A recolha regular de dados por animal é vantajosa segundo critérios de bem-estar animal, evitando a duplicação de ensaios que seria necessária se os resultados relativos à substância em estudo anteriormente recolhidos de outro modo (por exemplo, agregação de dados relativa a séries de animais) tivessem de ser examinados ulteriormente por autoridades reguladoras com outras exigências (por exemplo, dados individualizados por animal).

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA: BrdU--ELISA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA: BrdU--ELISA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 6). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (20 e capítulo B.4 do presente anexo). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose) e no dia 6. Complementarmente, no dia 6 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais em qualquer dia de medição constituem indicadores de irritação local excessiva (21) (22). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intensa (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (21) (22), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (30), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA: BrdU-ELISA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 6, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem grande sofrimento ou sinais de dor intensa devem ser eutanasiados (31).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2 e 3:* Repetir o procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

— *Dia 4:* Nenhum tratamento.

— *Dia 5:* Injetar intraperitonealmente 0,5 ml (5 mg/rato) de solução de bromodesoxiuridina (10 mg/ml).

— *Dia 6:* Anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Eutanasiar os animais 24 horas, aproximadamente, após a injeção de bromodesoxiuridina. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em solução-tampão de fosfato (PBS), separadamente para cada animal. Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (17). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos de cada rato, excisados bilateralmente, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com malha de 200 μm ou recorrendo a outra técnica aceitável para obtenção de suspensões unicelulares (por exemplo, utilizando um almofariz de plástico descartável para esmagar os gânglios linfáticos, seguindo-se a passagem através de um peneiro de *nylon* com malha de 70 μm). O processo de preparação da suspensão de células de gânglios linfáticos é um aspeto crítico deste ensaio, pelo que os operadores devem adestrar-se previamente. Os gânglios linfáticos dos animais de controlo negativo são pequenos, pelo que é necessário proceder com cuidado para evitar efeitos artificiais nos valores do índice de estimulação. O volume da suspensão de células de gânglios linfáticos deve ser o volume ótimo determinado para cada caso (aproximadamente 15 ml). O volume ótimo é o que permite obter uma absorvância média do grupo de controlo negativo compreendida entre 0,1 e 0,2.

Determinação da proliferação celular (medição do teor de bromodesoxiuridina do ADN dos linfócitos)

27. Determina-se o teor de bromodesoxiuridina pelo método ELISA com um conjunto comercial (por exemplo, o n.º de catálogo 11 647 229 001 da Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Adicionar rapidamente, em triplicado, 100 μl da suspensão de células de gânglios linfáticos a uma placa de microtitulação com alvéolos de fundo plano. Depois da fixação e da desnaturação das células, adicionar anticorpos anti-BrdU a cada alvéolo e deixar reagir. A seguir, remover por lavagem os anticorpos anti-BrdU e adicionar a solução do substrato, deixando formar-se o cromogénio. Medir a absorvância a 370 nm, utilizando como referência o comprimento de onda de 492 nm. As condições experimentais do ensaio devem ser sempre otimizadas (ver o ponto 26).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (31)

Pesos corporais

29. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação (IE) médio. Determina-se o índice de estimulação dividindo o valor médio do índice de marcação com bromodesoxiuridina/ /rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pelo valor médio do índice de marcação com bromodesoxiuridina do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1.

O índice de marcação com bromodesoxiuridina é definido do seguinte modo:

$$\text{Índice de marcação com bromodesoxiuridina} = (\text{ABS}_{em} - \text{ABS branco}_{em}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS branco}_{ref})$$

em que: em = comprimento de onda emitido; ref = comprimento de onda de referência.

31. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 1,6 (10). Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite (índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9) deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (3) (6) (32).

32. No caso das respostas positivas próximas do limite, com índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9, pode ser útil aos utilizadores terem em conta, juntamente com os valores de índice de estimulação, informações adicionais como a resposta à dosagem, sinais de toxicidade sistémica ou de irritação excessiva e, se for caso disso, a significância estatística, para confirmar se os resultados obtidos são positivos (10). Devem examinar-se também as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (4) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

33. A recolha de dados para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o solvente/ /excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartar outros (por vezes denominados "aberrantes").

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em quadros, indicando os valores de índice de marcação com bromodesoxiuridina correspondentes a cada animal, a média do índice de marcação com bromodesoxiuridina/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do solvente/excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

35. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— origem, número de lote e dados de garantia de qualidade/controlo de qualidade do fabricante (sensibilidade e especificidade dos anticorpos e limite de deteção) para o conjunto ELISA,

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio, caso tenha sido efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos (solvente/excipiente) ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo em paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua eutanásia programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— quadro de valores de índices de marcação com bromodesoxiuridina e de índices de estimulação para cada grupo de tratamento, por rato,

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) do índice de marcação com bromodesoxiuridina/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento,

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/ /llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ /immunotox/llna-ELISA/TMER.htm].

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K., Hoshuyama, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.

(13) OCDE (1992), Skin Sensitisation. Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(16) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(18) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(20) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/ /BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(26) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(33) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo "concordância" são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (33).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Falso negativo: Substância incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa (33).

Falso positivo: Substância incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa (33).

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente, que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também se designa por "reprodutibilidade entre laboratórios" (33).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por "reprodutibilidade no laboratório" (33).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (33).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.»